

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. v. Haunerschen
Kinderspital
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

**Duodenale VIP-Rezeptoren in der Dünndarmmukosa bei
Kindern mit nahrungsmittelinduziertem hyperkinetischen
Syndrom**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Stephan Hiedl
aus
München

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. J. Egger

2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. J. Schirra

Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Papoušek
Prof. Dr. W. von Suchodoletz

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 04.03.2004

INHALTSVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG.....	1
A. 1. Das hyperkinetische Syndrom	3
A. 1. 1. Definition	3
A. 1. 2. Prävalenz.....	3
A. 1. 3. Symptome	4
A. 1. 3. 1. Motorisches Verhalten.....	4
A. 1. 3. 2. Aufmerksamkeit.....	4
A. 1. 3. 3. Impulsivität	4
A. 1. 3. 4. Assoziierte, jedoch nicht obligate Symptome.....	4
A. 1. 4. Diagnose	5
A. 1. 4. 1. Differentialdiagnose des ADHD.....	9
A. 1. 5. Ätiologie	9
A. 1. 5. 1. Nahrungsmittel als Ursache des ADHD.....	10
A. 1. 6. Pathophysiologie.....	12
A. 1. 6. 1. Die Arousal-Theorie	12
A. 1. 6. 2. Die Inhibitionsdefizit-Theorie	12
A. 1. 6. 3. Bildgebende und neurophysiologische Befunde.....	13
A. 1. 6. 4. Biochemische und molekulargenetische Studien.....	15
A. 1. 7. Genetik und Umwelteinflüsse.....	16
A. 1. 8. Therapie	17
A. 1. 8. 1. Pharmakotherapie	17
A. 1. 8. 2. Verhaltenstherapie	18
A. 1. 8. 3. Psychotherapie	18
A. 1. 8. 4. Diätetische Behandlung	18
A. 1. 8. 4. 1. Hyposensibilisierung	20

A. 1. 9. Prognose.....	20
A. 2. VIP und der VIP-Rezeptor	22
A. 2. 1. Vasoaktives Intestinales Polypeptid	22
A. 2. 1. 1. Biochemische Struktur des Vasoaktiven Intestinalen Polypeptids.....	22
A. 2. 1. 2. Biosynthese des Vasoaktiven Intestinalen Polypeptids.....	24
A. 2. 1. 3. Physiologische Freisetzung und Metabolismus des Vasoaktiven Intestinalen Polypeptids	25
A. 2. 1. 4. Physiologische Wirkung des Vasoaktiven Intestinalen Polypeptids auf zellulärer Ebene.....	26
A. 2. 1. 5. Vorkommen und Wirkung des Vasoaktiven Intestinalen Polypeptids im menschlichen Organismus.....	26
A. 2. 1. 5. 1. Vorkommen und Wirkung des Vasoaktiven Intestinalen Polypeptids im Gastrointestinaltrakt	27
A. 2. 1. 5. 2. Vorkommen und Wirkung des Vasoaktiven Intestinalen Polypeptids im Zentralen Nervensystem.....	28
A. 2. 2. Der VIP-Rezeptor	29
B. MATERIAL UND METHODEN	32
B. 1. Auswahl der Patienten.....	32
B. 2. Durchführung der oligoantigenen Diät.....	32
B. 2. 1. Die erste Phase: erweiterte oligoantigene Diät.....	33
B. 2. 2. Die zweite Phase: Reintroduktion.....	35
B. 2. 3. Die dritte Phase: Reproduzierbarkeit	37
B. 3. Studiendesign.....	38
B. 4. Gewinnung des Untersuchungsmaterials.....	40

B. 4. 1. Dünndarmsaugbiopsie.....	40
B. 5. Rezeptorautoradiographie	40
B. 5. 1. Prinzip der Autoradiographie.....	40
B. 5. 2. Materialien	44
B. 5. 3. Versuchsvorbereitung	45
B. 5. 3. 1. Vorbehandlung der Objektträger	45
B. 5. 3. 2. Vorbereiten und Schneiden der Dünndarmbiopsien.....	45
B. 5. 3. 3. Vorbereiten der Reaktionsgefäße.....	46
B. 5. 4. Versuchsdurchführung	47
B. 5. 4. 1. Bindungsreaktion	47
B. 5. 4. 2. Trocknen	49
B. 5. 4. 3. Vorfixieren	49
B. 5. 4. 4. Entfetten	50
B. 5. 5. Mikroautoradiographie.....	50
B. 5. 5. 1. Emulsionsautoradiographie mittels Coverslip-Methode.....	50
B. 5. 5. 2. Entwickeln der Photoemulsion	52
B. 5. 5. 3. Kontrolle der Photoemulsion	52
B. 5. 6. Histologische Färbung der Gewebeschnitte.....	52
B. 5. 7. Computerunterstützte quantitative Bestimmung der Rezeptorendichte.....	53
B. 5. 8. Statistische Auswertung der quantitativen Bestimmung der Rezeptorendichte	54
B. 5. 9. Qualitätssicherung und Optimierung der autoradiographischen Methode.....	55
B. 5. 9. 1. Nachweis der biochemischen Intaktheit von VIP und ¹²⁵ J-VIP durch High Pressure Liquid Chromatography (HPLC).....	55
B. 5. 9. 2. Nachweis der biochemischen Intaktheit von ¹²⁵ J-VIP nach 180 Minuten Inkubationszeit durch High Pressure Liquid Chromatography (HPLC).....	56
B. 5. 9. 3. Optimierung der Versuchsbedingungen.....	57

B. 5. 9. 3. 1. Bestimmung der optimalen Polyethylenaminkonzentration im Präinkubationspuffer	57
B. 5. 9. 3. 2. Bestimmung der optimalen Inkubationszeit.....	57
B. 5. 9. 4. Evaluierung der biochemischen Ligand-Rezeptorbindung.....	58
B. 5. 9. 4. 1. Äquilibriumsbinding	59
B. 5. 9. 4. 2. Reversibilität der Ligandenbindung.....	59
B. 5. 9. 4. 3. Spezifität der ^{125}J -VIP-Bindung.....	59
C. ERGEBNISSE	61
C. 1. Daten der Patienten	61
C. 1. 1. Klinische Daten der Patienten.....	61
C. 1. 2. Provozierende Nahrungsmittel bei den Studienteilnehmern.....	62
C. 1. 3. Einfluß der Diät auf das Verhalten	63
C. 2. Ergebnisse der Vorversuche zur Optimierung und Qualitätssicherung der autoradiographischen Methode	64
C. 2. 1. Nachweis der biochemischen Intaktheit von VIP und ^{125}J -VIP durch High Pressure Liquid Chromatography (HPLC).....	64
C. 2. 1. 1. Nachweis der biochemischen Intaktheit von VIP vor Inkubation.....	64
C. 2. 1. 2. Nachweis der biochemischen Intaktheit von [3-Iodotyrosyl-I125] Vasoactive Intestinal Polypeptide (^{125}J -VIP) vor Inkubation.....	65
C. 2. 1. 3. Nachweis der Stabilität von [3-Iodotyrosyl-I125] Vasoactive Intestinal Polypeptide (^{125}J -VIP) nach 200 Minuten Inkubation.....	67
C. 2. 2. Bestimmung der optimalen Polyethylenaminkonzentration im Präinkubationspuffer	68
C. 2. 3. Bestimmung der optimalen Inkubationszeit.....	70
C. 2. 4. Bestimmung der Äquilibriumsbinding.....	71
C. 2. 5. Reversibilität der Ligandenbindung.....	72

C. 2. 6. Spezifität der ^{125}J -VIP -Bindung.....	73
C. 3. VIP-Rezeptorendichte im Dünndarm der untersuchten Patienten.....	74
C. 3. 1. Nachweis der totalen und unspezifischen Bindung.....	75
C. 3. 2. Histopathologische Untersuchung	76
C. 3. 3. Statistische Auswertung der VIP-Rezeptorendichte unter Diät und unter Provokation.....	76
D. DISKUSSION	92
D. 1. Patientenkollektiv	92
D. 2. Studiendesign.....	93
D. 3. Patientencompliance	94
D. 4. Autoradiographische Methode	94
D. 5. VIP-Rezeptorendichte im Duodenum der Patienten mit nahrungsmittelinduziertem hyperkinetischen Syndrom.....	95
E. ZUSAMMENFASSUNG.....	99
F. LITERATURVERZEICHNIS.....	100

A. Einleitung

„.....vom ersten Augenblick an, als ich die Klasse übernommen habe, war Susanne nicht zu zügeln. Sie war zappelig, konnte nicht still sitzen, verschaffte sich Bewegung, indem sie ständig mehr oder minder unbegründet zum Papierkorb lief. Auf diesem Weg gelang es ihr nur höchst selten, an den Tischen der Klassenkameraden vorbeizukommen, ohne anzurempeln, Federmäppchen herunterzustößen oder sonstwie Unruhe zu stiften. Für ihr Mißgeschick entschuldigte sie sich lautstark und wortreich, was den Unterricht erneut unterbrach. Auf ihrem eigenen Platz verbreitete sie jeden Morgen binnen kürzester Zeit unbeschreibliches Chaos. Nicht nur deshalb, sondern auch wegen ihres ständigen Redeflusses mußten alle Versuche, sie neben einem Banknachbarn sitzen zu lassen, wieder abgebrochen werden.

Susannes Ablenkbarkeit, ihre Unfähigkeit, sich über einen längeren Zeitraum hinweg auf eine Sache zu konzentrieren, führte natürlich zu mangelhaften Leistungen. Schriftliche Arbeiten wurden höchstens vier bis fünf Zeilen lang einigermaßen geordnet erledigt, dann zerfloß das Schriftbild und die Einträge verloren jegliche äußere Form Susanne war meinerseits nur durch ganz konsequente Führung in Schach zu halten und zu erträglichem Zusammenleben zu bringen, wobei sie hoffentlich doch das Gefühl hatte, daß man sie trotz allem mochte und sie niemals aufgab und fallenließ “ (Heigl, 1991).

Die vorangegangenen Sätze einer Lehrerin schildern anschaulich die Symptome des hyperaktiven Syndroms und die Konsequenzen, die sich daraus für die betroffenen Kinder und ihre Umwelt ergeben.

Bereits 1845 beschrieb der Frankfurter Nervenarzt und Dichter Dr. Heinrich Hoffmann mit seiner Geschichte über den „Zappelphilipp“ das Verhalten hyperkinetischer Kinder (Hoffmann, 1845). Heute, mehr als 150 Jahre später ist das hyperkinetische Syndrom durch ungehemmte Überaktivität, erhöhte Ablenkbarkeit, kurze Aufmerksamkeitsspanne, Impulsivität und ausgeprägte Stimmungsschwankungen in der internationalen Klassifizierung von Krankheiten (ICD 10, WHO, 1992) charakterisiert. Das hyperkinetische Syndrom zählt mit einer Prävalenz von drei bis sechs Prozent mittlerweile zu den häufigsten kinderpsychiatrischen Erkrankungen (Anderson, 1987; Baumgartel, 1995).

Durch ihr unangepaßtes Verhalten haben Kinder mit hyperkinetischem Syndrom, das meist im Kindergarten- oder Grundschulalter diagnostiziert wird, häufig Schwierigkeiten in der sozialen Integration. Die Unfähigkeit sich auf gestellte Aufgaben zu konzentrieren beeinträchtigt die schulischen Leistungen beträchtlich. Nicht selten wird das Verhalten der betroffenen Kinder zum unlösbaren Problem in der Familie und führt zu intrafamiliären Spannungen.

Trotz vielfachen Untersuchungen in den letzten Jahren, konnte eine eindeutige Ursache des hyperkinetischen Syndroms bisher nicht gefunden werden. Genetische Prädisposition und Störungen im Dopaminstoffwechsel des ZNS werden derzeit als Ursachen des hyperkinetischen Syndroms diskutiert und sind Gegenstand der aktuellen Forschungsbemühungen.

Durch die heute zur Verfügung stehenden bildgebenden Verfahren konnten bei hyperkinetischen Kindern zudem neuroanatomische Auffälligkeiten festgestellt werden. Die betroffenen Kinder scheinen sich durch eine Verkleinerung des präfrontalen Cortex, des Globus pallidus und des Corpus callosum von gesunden Kindern zu unterscheiden (Hynd, 1990; Castellanos, 1994; Filipek, 1997; Baumgardner, 1996; Aylward, 1996). In den vorallem für die Kontrolle der motorischen Aktivität und für die Aufmerksamkeit verantwortlichen

Hirnstrukturen findet sich neben einem verringerten Glucosemetabolismus eine Verminderung der Durchblutung (Lou, 1984, 1989, 1990; Zametkin, 1990, 1993).

Die bis heute unklare Ätiologie, die Beeinträchtigung der Patienten im Alltag und die oft verzweifelte Situation der Eltern führten in den letzten Jahrzehnten zur Entwicklung sehr verschiedener Therapiekonzepte mit unterschiedlichem Erfolg. Zu den derzeit etablierten Therapien des hyperkinetischen Syndroms zählen die Verabreichung von Psychostimulantien, die Anwendung von Verhaltenstherapien und diätetische Maßnahmen.

Vor mehr als 70 Jahren wurde erstmals ein Zusammenhang zwischen hyperaktivem Verhalten und der Einnahme bestimmter Nahrungsmittel vermutet (Rowe, 1928). Feingold postulierte 1975 Salicylate, künstliche Farbstoffe und Geschmacksverstärker als Auslöser des hyperkinetischen Syndroms. Tryphonas (1979) fand einen signifikanten Zusammenhang zwischen Nahrungsmittelallergie und hyperkinetischem Verhalten. In den folgenden Jahren häuften sich die Berichte über erfolgreiche Behandlungen des hyperkinetischen Syndroms mit Diät (Brenner, 1977; Rapp, 1978; Mattes, 1978; Swanson, 1980).

In großen kontrollierten, zum Teil doppelblind durchgeführten Studien wurde die Wirksamkeit der oligoantigenen Diät allerdings erst in den achtziger und neunziger Jahren nachgewiesen (Egger, 1985; Kaplan, 1989; Carter, 1993; Schulte-Körne, 1996).

Besteht nunmehr kein Zweifel an der Wirksamkeit der oligoantigenen Diät als nebenwirkungsarme Therapieform des hyperkinetischen Syndroms, bleibt die Frage nach dem Wirkungsmechanismus bisher vollkommen unbeantwortet. Zwar wird wiederholt das Vorliegen einer Nahrungsmittelallergie als Pathomechanismus aufgeführt, doch lassen sich klinische Symptome und Laborparameter nicht mit einer klassischen Nahrungsmittelallergie vereinbaren. Zudem ist derzeit unklar auf welchem Wege der Verzicht auf bestimmte Nahrungsmittel neurologische Symptome beeinflussen kann.

Die Erkenntnisse der bisher vorliegenden biochemischen und bildgebenden Befunde bei hyperkinetischen Kindern und die Möglichkeit, das hyperkinetische Syndrom über Nahrungsmanipulation erfolgreich zu behandeln, ließen Peptide der „brain-gut-axis“ in den Mittelpunkt unserer Bemühungen nach einer Erklärung des Wirkungsmechanismus einer oligoantigenen Diät rücken.

Vasoaktives Intestinales Polypeptid (VIP) zählt aufgrund seiner vielfältigen Wirkungen sowohl im Gastrointestinaltrakt als auch im Zentralen Nervensystem zu den wichtigsten Vertretern der „brain-gut hormones“.

Als das Vasoaktive Intestinale Polypeptid 1970 von Said und Mutt entdeckt wurde, glaubte man zunächst nur an ein auf den Gastrointestinaltrakt beschränktes Vorkommen von VIP. Erst in den nächsten Jahren wurde auch eine tragende Rolle in der Regulation der zerebralen Durchblutung und des zerebralen Glucosemetabolismus bekannt (Larson, 1976; McCulloch, 1983; Bevan, 1984).

Ziel unserer Crossover-Studie war es, herauszufinden, ob sich die VIP-Rezeptorendichte im Dünndarm von Kindern mit nahrungsmittelinduziertem hyperkinetischen Syndrom unter Diät bzw. Provokation verändert.

A. 1. Das hyperkinetische Syndrom

A. 1. 1. Definition

Der Krankheitsbegriff des hyperkinetischen Syndroms wird durch ein abnormes Verhaltensmuster eines Kindes oder eines Erwachsenen bestimmt. Um ein Verhalten als nicht der Norm entsprechend einzustufen bedarf es jedoch altersbezogener Normwerte. Diese bestehen wie bei vielen psychiatrischen Erkrankungen zunächst nicht aus meßbaren Größen, sondern definieren sich aus der Beobachtung durch Eltern, Lehrer/innen, Kindergärtner/innen, dem behandelnden Arzt, sowie aus subjektivem Empfinden.

Bereits der Begriff „hyperkinetisches Syndrom“ beinhaltet die erste Entität:

Hyperkinetisch: aus dem Griechischen: zuviel an Bewegung.

Desweiteren fordert der Begriff „Syndrom“ einen Symptomkomplex. Hierzu gehört die bei Patienten mit hyperkinetischer Störung beobachtete assoziierte Aufmerksamkeitsstörung. Im englischen Sprachgebrauch wird das hyperkinetische Syndrom als „Attention Deficit Hyperactivity Disorder“ abgekürzt ADHD, bezeichnet. Im Folgenden wird dieser Begriff verwendet werden.

Der Begriff des hyperkinetischen Syndroms läßt sich zunächst auf zwei Verhaltensauffälligkeiten eingrenzen:

Ein Übermaß an Bewegung bzw. Aktivität und einen Mangel an Aufmerksamkeitsfähigkeit.

Dementsprechend findet sich im *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, vierte Auflage, (DSM-IV) (American Psychiatric Association, 1994) folgende Unterteilung:

- der vorallem hyperaktive-impulsive Typ
- der vorallem aufmerksamkeitsgestörte Typ
- der kombinierte Typ

In der internationalen Klassifizierung von Krankheiten ICD 10 (WHO, 1992) wird der Begriff des hyperkinetischen Syndroms erweitert:

- ungehemmte, wenig organisierte und schlecht gesteuerte Überaktivität
- erhöhte Ablenkbarkeit
- kurze Aufmerksamkeitsspanne
- Impulsivität

A. 1. 2. Prävalenz

Das Attention Deficit Hyperactivity Disorder-Syndrom zählt zu den häufigsten Erkrankungen in der Kinderpsychiatrie. Die Prävalenz bei Kindern liegt zwischen drei und sechs Prozent, abhängig von der jeweiligen Studie sowie von kulturellen und geographischen Gegebenheiten. Jungen sind dreimal häufiger als Mädchen betroffen (Anderson, 1987; Baumgartel, 1995; Szatmari, 1992; Wang, 1993; Goldman, 1998).

Für das geschlechtliche Ungleichgewicht gibt es keine befriedigende Erklärung. Eine mögliche Ursache beschreibt Berry in seiner Studie (1985), indem er bei Mädchen eine Symptomverlagerung in den kognitiven und sprachlichen Bereich vermutet. Die betroffenen Mädchen werden seltener diagnostiziert, da sich die Umwelt durch die verhaltensbetonten Störungen der Jungen stärker beeinträchtigt fühlt. Die bei Mädchen und Jungen verschieden

ausgeprägten Symptomschwerpunkte werden auch durch die große Studie von Tirosh (1998) bestätigt.

A. 1. 3. Symptome

A. 1. 3. 1. Motorisches Verhalten

Die Hyperaktivität ist eines der Hauptmerkmale der an ADHD leidenden Kinder. Die Patienten scheinen ständig unter „Spannung“ zu stehen, können kaum ruhig sitzen, laufen scheinbar wahllos im Zimmer herum. Häufig wird auch ein ständiges Herumrutschen auf dem Stuhl, ein kaum pausierendes Bewegen von Füßen und Beinen beschrieben.

Diese Verhaltensauffälligkeiten finden sich sowohl im als auch außerhalb des elterlichen Zuhauses.

Mehrere Arbeiten konnten die Hyperaktivität im Vergleich zu verhaltensunauffälligen Kindern auch quantitativ bestätigen. So fanden Zyss und Hassler (1992), daß sich bei 55 Jungen mit ADHD mehr als doppelt so viele Körperbewegungen pro Zeiteinheit messen lassen als dies bei verhaltensunauffälligen Jungen der Fall war. Eine weitere Studie zeigte, daß Jungen mit ADHD 2,3-mal so viele Kopfbewegungen durchführten und den Kopf 3,4-mal weiter bewegten, als eine gesunde Kontrollgruppe (Teicher, 1996).

A. 1. 3. 2. Aufmerksamkeit

Die Unaufmerksamkeit ist vorallem eine im schulischen und sozialen Bereich auffallende Beeinträchtigung. Die Betroffenen sind oft nicht in der Lage Einzelheiten zu beachten, es häufen sich Flüchtigkeitsfehler. Bevor eine Aufgabe zu Ende geführt wurde, wird mit einer neuen begonnen. Die Aufmerksamkeitsspanne ist reduziert und oft kommt es zur Ablenkung durch nebensächliche Dinge.

A. 1. 3. 3. Impulsivität

Die Impulsivität manifestiert sich als Ungeduld und als Schwierigkeit, Reaktionen zurückzuhalten. Die Betroffenen platzen z. B. häufig mit Antworten heraus, bevor eine Frage vollständig gestellt wurde. Andere Personen werden unterbrochen oder so sehr gestört, daß es zu Problemen im sozialen und schulischen Bereich kommt. Eine geringe Frustrationstoleranz fördert Aggressivität und Wutausbrüche.

Die Impulsivität kann durch unüberlegtes Handeln zu häufigeren Unfällen führen (Weiss, 1979; Beck, 1996), zudem werden die Handlungskonsequenzen oft nicht bedacht.

A. 1. 3. 4. Assoziierte, jedoch nicht obligate Symptome

- Gehäuft finden sich bei Kindern mit ADHD Lernschwierigkeiten. Diese liegen in den Bereichen des Rechnens, Lesens und der Rechtschreibung (Faraone, 1993).

- Eine Assoziation mit einem niedrigeren Intelligenzquotienten konnte nicht gesichert werden. Vielmehr dürfte die Ursache für Lernschwierigkeiten in der verminderten Aufmerksamkeitsfähigkeit begründet sein.
- Patienten mit ADHD zeigen im Vergleich zu Kontrollgruppen signifikant häufiger sprachliche Defizite (Tirosh, 1998).
- Erst kürzlich konnte gezeigt werden, daß bei Kindern mit ADHD die motorische Koordination eingeschränkt ist. Patienten, die zur diagnostischen Gruppe des überwiegend aufmerksamkeitsgestörten Typs gehören, zeigen häufiger eine Beeinträchtigung der Feinmotorik, während Patienten des kombinierten Typs grobmotorische Defizite aufweisen (Piek, 1999).
- Häufig von Eltern berichtete begleitende Symptome sind Aggressivität und Distanzlosigkeit. In einer sorgfältig durchgeführten Studie zeigte sich jedoch, daß Aggressivität nur bei wenigen hyperkinetischen Kindern im Frühstadium vorhanden ist, sodaß es sich hierbei wohl um Reaktionen auf die allgemeine soziale Ablehnung, die betroffene Kinder immer wieder erfahren, handeln dürfte (Weiss, 1971; Satterfield, 1982).
- Bezüglich somatischer Beschwerden, klagen vorallem Jungen gehäuft über Bauchschmerzen (Egger, 1999).
- Kinder mit ADHD leiden gehäuft an Schlafproblemen (Dagan, 1997; Marcotte, 1998).

A. 1. 4. Diagnose

Zur Diagnose des ADHD werden heute allgemein die Diagnosekriterien nach dem *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, vierte Auflage, (DSM-IV) (American Psychiatric Association, 1994) und des ICD 10 (WHO, 1992) verwendet.

Als Beispiel werden in *Tab. 1* die diagnostischen Kriterien des DSM-IV aufgeführt:

DSM-IV: Diagnosekriterien

A. Entweder Punkt 1 oder Punkt 2 müssen zutreffen:

1. sechs (oder mehr) der folgenden Symptome von Unaufmerksamkeit sind während der letzten sechs Monate beständig in einem mit dem Entwicklungsstand des Kindes nicht zu vereinbarenden und unangemessenen Ausmaß vorhanden gewesen:
 - a, beachtet häufig Einzelheiten nicht oder macht Flüchtigkeitsfehler bei den Schularbeiten, bei der Arbeit oder bei anderen Tätigkeiten;
 - b, hat oft Schwierigkeiten längere Zeit die Aufmerksamkeit bei Aufgaben oder beim Spielen aufrechtzuerhalten;
 - c, scheint häufig nicht zuzuhören, wenn andere ihn/sie ansprechen;
 - d, führt häufig Anweisungen anderer nicht vollständig durch und kann Schularbeiten, andere Arbeiten oder Pflichten am Arbeitsplatz nicht zu Ende bringen (nicht aufgrund oppositionellen Verhaltens oder Verständnisschwierigkeiten);
 - e, hat häufig Schwierigkeiten, Aufgaben und Aktivitäten zu organisieren;
 - f, vermeidet häufig, hat eine Abneigung gegen oder beschäftigt sich häufig nur widerwillig mit Aufgaben, die längerandauernde geistige Anstrengungen erfordern (wie Mitarbeit im Unterricht oder Hausaufgaben);
 - g, verliert häufig Gegenstände, die er/sie für Aufgaben oder Aktivitäten benötigt (z. B. Spielsachen, Hausaufgabenhefte, Stifte, Bücher oder Werkzeug);
 - h, läßt sich öfter durch äußere Reize leicht ablenken;
 - i, ist bei Alltagstätigkeiten häufig vergeßlich;
2. sechs (oder mehr) der folgenden Symptome der Hyperaktivität und Impulsivität sind während der letzten sechs Monate beständig in einem mit dem Entwicklungsstand des Kindes nicht zu vereinbarenden und unangemessenen Ausmaß vorhanden gewesen.
 - a, zappelt häufig mit Händen oder Füßen oder rutscht auf dem Stuhl herum;
 - b, steht in der Klasse oder in anderen Situationen, in denen Sitzenbleiben erwartet wird, häufig auf;
 - c, läuft häufig herum oder klettert exzessiv in Situationen, in denen dies unpassend ist (bei Jugendlichen oder Erwachsenen kann dies auf ein subjektives Unruhegefühl beschränkt bleiben);
 - d, hat häufig Schwierigkeiten, ruhig zu spielen oder sich mit Freizeitaktivitäten ruhig zu beschäftigen;
 - e, ist häufig „auf Achse“ oder handelt oftmals, als wäre er/sie „getrieben“;
 - f, redet häufig übermäßig viel;
 - g, platzt häufig mit den Antworten heraus, bevor die Frage zu Ende gestellt ist;
 - h, kann nur schwer warten, bis er an der Reihe ist;
 - i, unterbricht und stört andere häufig (platzt z. B. in Gespräche oder in Spiele anderer hinein);

B. Einige Symptome der Hyperaktivität-Impulsivität oder Unaufmerksamkeit, die Beeinträchtigungen verursachen, treten bereits vor dem Alter von sieben Jahren auf.
C. Beeinträchtigungen durch diese Symptome zeigen sich in zwei oder mehr Bereichen (z. B. in der Schule bzw. am Arbeitsplatz und zu Hause).
D. Es müssen deutliche Hinweise auf klinisch bedeutsame Beeinträchtigungen der sozialen, schulischen oder beruflichen Funktionsfähigkeit vorhanden sein.
D. Es müssen deutliche Hinweise auf klinisch bedeutsame Beeinträchtigungen der sozialen, schulischen oder beruflichen Funktionsfähigkeit vorhanden sein.
E. Die Symptome treten nicht ausschließlich im Verlauf einer tiefgreifenden Entwicklungsstörung, Schizophrenie oder einer anderen psychotischen Störung auf und können auch nicht durch eine andere psychische Störung besser erklärt werden (z. B. affektive Störung, Angststörung, dissoziative Störung oder eine Persönlichkeitsstörung).

Tab. 1

Diagnose des Subtypus:

- Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung, Mischtypus:
liegt vor, wenn die Kriterien A1 und A2 während der letzten sechs Monate erfüllt waren.
- Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung, vorwiegend unaufmerksamer Typus:
liegt vor, wenn Kriterium A 1, nicht aber Kriterium A 2 während der letzten sechs Monate erfüllt war.
- Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung vorwiegend hyperaktiv-impulsiver Typus:
liegt vor, wenn Kriterium A2, nicht aber Kriterium A1 während der letzten sechs Monate erfüllt war.

Zur Beurteilung des Schweregrades und Krankheitsverlaufs unter Therapie findet die Conners Skala eine weitverbreitete Anwendung (Conners, 1973). Hierbei werden 10 Symptome des ADHD je nach Grad der Ausprägung mit 0-3 Punkten bewertet (Tab. 2).

Conners-Skala zur Verhaltensbeurteilung hyperaktiver Kinder	
<u>Beobachtete Symptome</u>	<u>Bewertung (Punkte)</u>
1. rastlos, dauernd in Bewegung	
2. reizbar, impulsiv	
3. stört andere Kinder	
7. kann nicht warten, leicht enttäuscht und frustrierbar	
4. kurze Aufmerksamkeitsspanne, beginnt alles und führt nichts zu Ende	
5. zappelt dauernd	
6. unaufmerksam, leicht ablenkbar	
8. weint schnell und häufig	
9. Stimmung wechselt rasch und extrem	
10. neigt zu Wutausbrüchen, explosiv, unberechenbar	
Zusatz: 11. Schlafstörungen	

Tab. 2

Ausprägung der Symptome nach Punkten:

gar nicht vorhanden:

0 Punkte

leicht vorhanden:

1 Punkt

deutlich ausgeprägt:

2 Punkte

sehr stark ausgeprägt:

3 Punkte

A. 1. 4. 1. Differentialdiagnose des ADHD

Bei den differentialdiagnostischen Erwägungen muß zwischen Krankheiten, die Verhaltensauffälligkeiten als Begleitsymptom zeigen und Krankheiten die das Verhalten beeinflussen unterschieden werden.

Folgende Verhaltensauffälligkeiten können ähnliche Symptome wie das hyperkinetische Syndrom zeigen:

- Störung des Sozialverhaltens (Conduct disorders)
- Lernbehinderung
- oppositionelles Trotzverhalten
- Tourette Syndrom
- Sprech- oder Sprachbehinderung.

Oft besteht eine symptomatische Überlappung, so daß eine klare differentialdiagnostische Abgrenzung schwierig wird.

Zudem können sich bei nachstehend genannten Erkrankungen eine Beeinflussung des Verhaltens in Richtung Hyperaktivität und Aufmerksamkeitsstörung als Begleitsymptome zeigen:

- Angstneurosen
- Psychosen
- Medikamenten- und Drogenabhängigkeit
- generalisierte Resistenz gegen TSH, Hyperthyreose (Hauser, 1993; Weiss, 1993).

A. 1. 5. Ätiologie

Auch wenn es mittlerweile gelungen ist das Krankheitsbild des ADHD einheitlich zu definieren sowie zuverlässige und reproduzierbare Diagnosekriterien zur Verfügung zu haben, bleibt die Frage nach der Ursache des ADHD bisher unbeantwortet.

Vielmehr finden sich heute, wohl dem heterogenen Krankheitsbild entsprechend, eine Vielzahl möglicher krankheitsauslösender, krankheitsbegünstigender oder krankheitsbeeinflussender Ursachen. Dabei zeigt sich zunehmend, daß definierbare pathologische Konstellationen nur für bestimmte, in der Regel kleine Patientengruppen bewiesen werden können.

Folgende Mechanismen oder Krankheiten wurden bisher mit dem Entstehen eines hyperkinetischen Syndroms in Verbindung gebracht:

- Entwicklungsbedingte Hyperaktivität als normale Reifungsvariante
- Vererbung
- Neurotransmitterstörung
- Sozialisationsdefizit (Unterschichtfamilien, desorganisierte Familien)
- perinatale Probleme
- Nahrungsmittelunverträglichkeit
- Überempfindlichkeit gegen Salicylate und synthetische Nahrungsmittelzusätze

A. 1. 5. 1. Nahrungsmittel als Ursache des ADHD

Ein möglicher Zusammenhang zwischen hyperkinetischem Verhalten und Nahrungsmitteln wurde in der Literatur erstmals zu Beginn des letzten Jahrhunderts erwähnt. Shannon führte bereits 1922 vermehrte Unruhe und Schlafstörungen bei Kindern auf eine Nahrungsmittelallergie zurück. Nach dem Weglassen zuvor getesteter Lebensmittel, wie z. B. Eier, Tomaten und Getreide, kam es zu einer Besserung bzw. zum Verschwinden der Symptome.

Ebenso beschrieb Rowe (1928) einen Zusammenhang zwischen Nahrungsmittelallergie und Verhaltensauffälligkeiten bei Erwachsenen. Häufig wurden mehrere Nahrungsmittel für verstärkte Müdigkeit, unruhigen Schlaf, hyperkinetisches Verhalten und Konzentrationsstörungen verantwortlich gemacht (Randolph, 1947).

Auch Crook (1961) unterstützte die Allergie-Hypothese nach einer Studie an 50 Kindern mit hyperkinetischen Verhaltensweisen. Als häufigste Auslöser fanden sich Milch, Getreide, Eier und Schokolade.

In der Studie von Tryphonas (1979) fand sich eine hoch signifikante Korrelation zwischen im RAST nachgewiesenen Nahrungsmittelallergien und hohen Conners'-Scores.

1973 wurden von Goldberg erstmals künstliche Lebensmittelzusätze, wie Farb-, Konservierungs- und Geschmacksstoffe, als möglicher Auslöser für hyperkinetisches Verhalten angeschuldigt.

Feingold berichtete 1975 über einen möglichen Zusammenhang zwischen der Einnahme von Salicylaten und Nahrungszusätzen wie synthetische Farbstoffe und Konservierungsmittel als Ursache hyperaktiver Störungen. Nach ihm wurde der Begriff „Feingold-Hypothese“ geprägt und eine spezielle Diät entwickelt, die auf künstliche Zusatzstoffe in Lebensmitteln und auf Salicylate verzichtete. Feingold beschrieb bei 70% der mit seiner Diät behandelten Patienten eine Besserung der Symptome.

Die Meinungen bezüglich dieses Therapieansatzes waren jedoch in der Literatur von Anfang an kontrovers. Vorallem wurde Feingold fehlende Objektivität, impressionistische Beschreibung und das Ausbleiben kontrollierter Studien vorgeworfen.

In einer Reihe von Studien konnte allerdings der Einfluß von Nahrungsmittelzusätzen auf das Verhalten hyperkinetischer Kinder nachgewiesen werden (Brenner, 1977; Rapp, 1978; Stine, 1976; Matthes, 1978; Swanson, 1980; Rowe, 1988).

Conners (1976) konnte die Ergebnisse von Feingold nur teilweise nachvollziehen, ebenso wie Williams (1978), die mit Psychostimulantien wesentlich bessere Ergebnisse als mit der Feingold-Diät erzielten. Thorley (1984) und Wender (1986) konnten keinen signifikanten Einfluß auf hyperaktive Patienten feststellen, Weiss (1980) hingegen postulierte sogar Auswirkungen künstlicher Farbstoffe auf das Verhalten gesunder Kinder.

Zusammenfassend ließ sich in keiner der Studien eine spezifische Wirkung der Feingold-Diät nachweisen, positive Effekte jedoch, Placebo-Wirkung nicht ausgeschlossen, fanden sich häufiger.

Aus heutiger Sicht lassen sich die Schwierigkeiten bei der Interpretation dieser Studien vorallem auf methodische Fehler zurückführen wie das Fehlen einer Auswaschphase, zu kurze Beobachtungszeiten nach Verabreichung der Testsubstanzen oder Maskierung der Testsubstanzen mit Schokoladendrinks.

Parallel zur oben genannten Hypothese entstand 1975 die Vermutung stark phosphathaltige Nahrung könne zu Verhaltensauffälligkeiten führen (Hafer, 1975). Diese Hypothese wurde jedoch in keiner Untersuchung bestätigt. Eine kontrollierte Diät-Studie von Walther (1982) konnte keinen Zusammenhang zwischen Belastung mit Nahrungsmittelphosphat und hyperkinetischem Verhalten herstellen. Die phosphatreduzierte Diät wurde

ernährungswissenschaftlich analysiert und sogar als bedenklich eingestuft (Droese, 1978), da bei Phosphatreduktion unter eine bestimmte Grenze mit Gesundheitsschäden zu rechnen ist.

Ausgehend von den widersprüchlichen Ergebnissen der Feingold-Diät wurden die bisher streng auf Nahrungsmittelzusätze und Salicylate begrenzten Diäten erweitert, indem auch Nahrungsmittel selbst als Auslöser hyperaktiven Verhaltens verantwortlich gemacht wurden und in Diäten ausgetestet wurden.

Seit 1980 wurden mehrere doppelblinde, placebokontrollierte Studien durchgeführt, die den Zusammenhang zwischen Nahrungsmitteln und Hyperaktivität prüfen sollten.

Aufsehen erregte die große Studie von Egger 1985, in der erstmals unter kontrollierten Bedingungen bei 62 von 76 untersuchten Patienten mit ADHD eine signifikante Verbesserung der Verhaltensauffälligkeiten unter oligoantigener Diät nachgewiesen werden konnte. 21 Patienten zeigten unter Diät sogar ein völliges Verschwinden der Symptome. Reproduzierbar kam es unter provozierender Nahrung wieder zu den Symptomen des ADHD. Bereits Swanson (1980) konnte unter Doppelblind-Testung die Beeinflussbarkeit des ADHD durch bestimmte Nahrungsmittel beweisen.

Kaplan zeigte 1989 in einer placebokontrollierten Studie, daß sich unter oligoantigener Diät bei über 50% von 24 Patienten mit ADHD eine Verhaltensbesserung erreichen ließ.

In einer 78 ADHD-Patienten umfassenden kontrollierten Studie von Carter (1993) konnte mit oligoantigener Diät bei 59 Patienten eine signifikante Verhaltensbesserung erreicht werden. Auch in dieser Studie konnte nach Identifikation der provozierenden Nahrungsmittel doppelblind das erneute Auftreten der Symptome durch Gabe der provozierenden Nahrungsmittel bewiesen werden.

Weitere Studien, die den Einfluß von Nahrungsmitteln auf das hyperkinetische Syndrom belegten, wurden von Swanson (1980), Boris (1994) und Schulte-Körne (1996) durchgeführt.

A. 1. 6. Pathophysiologie

Wie in den bisherigen Ausführungen beschrieben, existiert eine allgemeingültige Ursache des ADHD bisher nicht. Dies hat zur Folge, daß die Untersuchungen zur Pathophysiologie des ADHD zunächst von der Symptomkonstellation des Krankheitsbildes ausgehen müssen.

Zu unterscheiden sind der psychopathologische, der neurophysiologische und der neurobiochemische Ansatz.

A. 1. 6. 1. Die Arousal-Theorie

Dieser psychopathologische Erklärungsansatz bezieht sich auf eine im Vergleich zu gesunden Kindern gestörte Vigilanz. Hierzu existieren zwei alternative Modelle. Einmal wird ein sogenanntes „Hyperarousal“ postuliert, indem die betroffenen Kinder nicht fähig sind „Stimuli-Inputs“ zu filtern. Dies führt aufgrund der übermäßigen sensorischen Stimulierung zu einer sensorischen Überladung, die hyperaktives Verhalten zur Folge hat (Strauss, 1947).

Alternativ wurde von Weinberg (1990) die Vorstellung des sogenannten „Hypoarousal“ geprägt. Eine verminderte Vigilanz bewirkt eine Reduktion der zentralnervösen Inhibitorfunktion. Sensorische Stimulationen führen daher zu einer inadäquat heftigen und unkontrollierten motorischen Aktivität. In diesem Zusammenhang wurde bei Kindern mit ADHD ein Mangel an zentralnervösem Adrenalin vermutet. Der Behandlungserfolg mit Psychostimulantien bei Kindern mit ADHD unterstützt diese Theorie (Hunt, 1988).

A. 1. 6. 2. Die Inhibitionsdefizit-Theorie

In den letzten zehn Jahren wurde zunehmend das Fehlen oder eine Verringerung der zentralgesteuerten Hemmung bestimmter Verhaltensweisen als psychopathologischer Ansatz des ADHD favorisiert.

Gray (1982) und Quay (1988, 1997) sehen normgerechtes Verhalten als das Resultat zweier gegengerichteter Kontrollmechanismen: das sogenannte verhaltenshemmende und das verhaltensaktivierende System. Bei Kindern mit ADHD wird von ihnen eine verminderte Aktivität des hemmenden Systems vermutet; dies führt zu einem Überwiegen des verhaltensaktivierenden Systems.

Barkley (1997) erweitert das Modell der mangelnden Hemmung, indem die verschiedenen Symptome des ADHD miteinbezogen werden. Demnach werden durch eine verminderte Verhaltenshemmung vier exekutive neuropsychologische Fähigkeiten (Arbeitsgedächtnis, Selbstregulation der Affekt-Motivations-Erregung, Sprachinternalisierung und Rekonstitution) beeinflußt.

Als neuroanatomischer Ausgangspunkt des verhaltenshemmenden Systems gilt der präfrontale Cortex mit seinen Verbindungen zum septohippocampalen System. Die Aktivität des verhaltenshemmenden Systems hängt wiederum von noradrenergen Stimuli aus dem Locus coeruleus und serotonergen Stimuli aus dem Raphekern ab. Als Ursache des Ungleichgewichts der beiden gegengesetzten verhaltenssteuernden Systeme werden genetische und entwicklungsbedingte Ursachen vermutet (Tannock, 1998).

Im Gegensatz dazu werden von Pribram (1975) und Sanders (1983) die Basalganglien und eine Dysfunktion des dopaminergen Systems für das Modell der „Hemmung als Dysfunktion im Leistungs/Aktivierungs-System“ verantwortlich gemacht. Diese Theorie unterscheidet

zwischen laufenden Prozessen und statischen bzw. energetischen Zuständen, die einfache Verhaltensoperationen beeinflussen.

Drei energetische Systeme werden angenommen:

- Erregung, die die sensorische Aktivität aktiviert,
- Aktivierung, die auf die Kontrolle motorischer Bereitschaft bezogen ist,
- Leistung, die durch Motivationsfaktoren (Wissen um das Ergebnis, Auszahlen der Handlung, Selbstbestimmung versus Fremdbestimmung) beeinflusst wird.

Insbesondere die beim ADHD zu beobachtenden verlangsamten und ungenauen motorischen Antworten auf Stimuli, sollen Ausdruck fehlerhafter Leistungs- bzw. Aktivierungsprozesse sein (Sergeant, 1995; Van der Meere, 1996).

Es muß allerdings kritisch bemerkt werden, daß die den psychopathologischen Modellvorstellungen zugrunde liegenden psychometrischen Tests keine scharfe Abgrenzung zwischen Aufmerksamkeit, Impulsivität, Exekutivfunktion etc. erlauben.

A. 1. 6. 3. Bildgebende und neurophysiologische Befunde

Durch die inzwischen routinemäßige Verwendung der Computer- und Kernspintomographie in der Pädiatrie sind vergleichende Untersuchungen des Cerebrums von Patienten mit ADHD und gesunden Kontrollgruppen möglich geworden. Zahlreiche Studien mit insgesamt über 370 ADHD-Patienten sind bisher durchgeführt worden.

Für eine sachgerechte Beurteilung der Ergebnisse ist es allerdings notwendig die bisher vorliegenden Erkenntnisse über das kindliche, gesunde Gehirn zu erwähnen.

Das Gehirnvolumen weiblicher Schulkinder ist um ca. 7% kleiner als das gleichaltriger Jungen (Filipek, 1994).

Groß- und Kleinhirn sind bei Männern größer als bei Frauen, während der weibliche Lobus caudatus disproportional größer ist (Filipek, 1994; Giedd, 1996).

Eine altersbezogene Abnahme der Größe des Nucleus caudatus und des Putamens und eine wiederum altersabhängige Größenzunahme der Seitenventrikel scheint männerspezifisch zu sein (Giedd, 1996).

- Drei MRT-Studien mit insgesamt 75 ADHD-Patienten zeigten einen kleineren präfrontalen Cortex bei ADHD-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (Hynd, 1990; Castellanos, 1994; Filipek, 1997).
- Die bei gesunden Jungen nachgewiesene altersbezogene Größenabnahme des Nucleus caudatus konnte bei männlichen ADHD-Patienten nicht nachgewiesen werden (Castellanos, 1996).
- Zudem konnte in allen den Globus pallidus einbeziehenden Studien gezeigt werden, daß dieser im Vergleich zur Kontrollgruppe bei ADHD-Patienten kleiner ist. Dagegen konnten in keiner der Vergleichsstudien Veränderungen des Putamens nachgewiesen werden (Singer, 1993; Castellanos, 1996; Castellanos, 1996; Aylward, 1996).
- In fünf von sechs Studien konnte eine Verkleinerung des Corpus callosum gezeigt werden (Baumgardner, 1996; Castellanos, 1996; Giedd, 1994; Hynd, 1991; Semrud-Clikeman, 1994).
- Castellanos (1996) berichtet über ein insgesamt verringertes Großhirn- und Kleinhirnvolumen.
- Anhand der Größenmessung des rechten Globus pallidus, der Symmetrie des Nucleus caudatus und des Kleinhirnvolumens konnte Castellanos (1996) 73% der Studienteilnehmer korrekt der Patientengruppe mit ADHD bzw. der gesunden Kontrollgruppe zuordnen.

Bemerkenswert ist, daß die erwähnten Befunde der kraniellen Bildgebung mit den psychoanatomischen Strukturen wie sie oben erwähnt wurden, in ihrer Lokalisation übereinstimmen.

In den zahlreichen EEG-Studien mit ADHD-Patienten fanden sich ebenfalls Auffälligkeiten im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen. Allerdings zeigen die verschiedenen Studien unterschiedliche Ergebnisse. So zeigten mehrere Arbeiten eine vermehrte „slow-wave“ (theta)-Aktivität vorallem in der Frontalregion (Matsuura, 1993; Chabot, 1996; Mann, 1992). Dagegen berichtet Kuperman über eine verminderte Delta- und/oder gesteigerte Beta-Band RPP (relative per cent power), insbesondere über der linken Hemisphäre.

Steinhausen (1984) konnte aufgrund von EEG-Veränderungen Vorhersagen über die Effektivität einer medikamentösen Stimulantientherapie treffen.

Einen Einfluß diätetischer Faktoren auf die topographische elektrische Hirnaktivität beim nahrungsmittelinduzierten hyperkinetischen Syndrom konnte Uhlig (1992) nachweisen. Unter Vermeidung provozierender Lebensmittel zeigte sich frontotemporal eine signifikante Abnahme der β_1 -Aktivität. Diese Befunde wurden als eine veränderte kognitive Informationsverarbeitung, die zum Teil im prämotorischen Cortex stattfindet, interpretiert.

In einer mehrere ERP (Event-Related Potentials)-Studien zusammenfassenden Interpretation zeigen sich Hinweise, daß bei ADHD-Patienten Störungen in der zentralen Erregungsverarbeitung und eine Hypo-Reaktivität auf Stimuli vorliegen (Klorman, 1991). Diese Befunde würden mit der von Seargent (1995) aufgestellten These des „energetischen Konzepts“ übereinstimmen.

Sehr interessante und zum Verständnis der Pathophysiologie des ADHD beitragende Befunde konnten durch Untersuchungen des Neurometabolismus erbracht werden.

Mehrere Studien mit $^{133}\text{Xenon}$ Inhalation und Emmissions-CCT wurden von Lou durchgeführt (Lou, 1984; Lou, 1989; Lou, 1990). In allen drei Arbeiten konnte bei Kindern mit ADHD eine verminderte cerebrale Durchblutung der Frontallappen und des Striatums nachgewiesen werden. Nach Gabe von Methylphenidat zeigte sich eine Steigerung der cerebralen Durchblutung. Aufgrund dieser Befunde postulierte Lou eine primäre Dysfunktion des Striatums, indem er eine verminderte striatale Hemmung der multisensorischen Aktivität vermutete.

In PET-Studien an ADHD-Patienten fand sich ein verminderter Glucosemetabolismus im prämotorischen Cortex, im superioren präfrontalen Cortex, im Striatum, Thalamus und Hippocampus (Zametkin, 1990; Zametkin, 1993). Es ist bekannt, daß vorallem diese Hirnstrukturen auf die Kontrolle der motorischen Aktivität und auf die Aufmerksamkeit Einfluß nehmen. Die oben erwähnte Veränderung der β_1 -Aktivität (Uhlig, 1992) in den frontotemporalen Regionen ist mit dem Bild einer Perfusionsstörung vereinbar.

Interessanterweise zeigten die weiblichen ADHD-Patienten eine stärkere Verminderung des Glucosemetabolismus als die männlichen Patienten (Zametkin, 1993; Ernst, 1994).

Sieg (1995) konnte anhand von ^{123}I IMP SPECT-Aufnahmen bei ADHD-Patienten eine erhöhte Speicherungsasymmetrie mit verringerter Aktivität in der linken Frontal- und Parietalregion nachweisen. Da die Frontalregionen in der cerebralen Reifung zuletzt myelinisiert werden, erwägte Sieg aufgrund dieser Befunde Reifungsdefizite des ZNS im Rahmen einer verzögerten Myelinisierung. Einschränkend müssen jedoch die großen Altersunterschiede (6-16 Jahre) der Studienteilnehmer erwähnt werden.

Anhand von small-scale fMRI-Aufnahmen wurde die funktionale Neuroaktivierung während eines visuellen Stop-Signaltests bei erwachsenen ADHD-Patienten untersucht (Rubia, 1997).

Alle ADHD-Patienten zeigten eine verminderte Gehirnaktivierung in Regionen der rechten Hemisphäre und eine gesteigerte Aktivierung in subcorticalen Bereichen.

A. 1. 6. 4. Biochemische und molekulargenetische Studien

Eine sichere Zuordnung des hyperkinetischen Syndroms zu einer bestimmten Neurotransmitterstörung konnte bisher nicht gelingen. Seit den letzten Jahren konzentrieren sich jedoch die biochemischen und molekulargenetischen Forschungsansätze auf das dopaminerge System. Vorallem aus zwei Gründen scheint das dopaminerge System in die Ätiologie des ADHD involviert zu sein:

- die gesicherte Wirksamkeit von Pharmaka, die primär auf das dopaminerge und noradrenerge System wirken.
- die aufgrund der bildgebenden Diagnostik gewonnene Erkenntnis, daß sich bei ADHD-Patienten gerade in den cerebralen Bereichen Auffälligkeiten zeigen, die eine wesentliche dopaminerge Innervation zeigen.

Da das Attention Deficit Hyperactivity Disorder-Syndrom eine vererbare Komponente aufweist und die zur Therapie eingesetzten Medikamente (Methylphenidate, Dextroamphetamine, Bupropion) den Dopamin-Transporter hemmen, konzentrierten sich die Arbeiten auf das Dopamin-Transporter-Gen.

Cook konnte 1995 den Zusammenhang zwischen ADHD und einem Allel (480bp) des Dopamintransporterlocus (DAT1) nachweisen. Diese Ergebnisse konnten von Gill (1997), Waldman (1998) und Daly (1999) reproduziert werden.

Weitere Forschungsarbeiten untersuchten das D4-Dopamin-Rezeptorgen, das einen von fünf bekannten postsynaptischen Dopaminrezeptoren kodiert. Neuroanatomisch findet sich dieser Rezeptor im dorsolateralen Bereich des präfrontalen Cortex und scheint daher bei der Kontrolle der Aufmerksamkeit eine Rolle zu spielen. Von diesem Gen ist ein Polymorphismus bekannt, indem ein 48bp langer Bereich in der dritten zytoplasmatischen Schleife zwischen zwei- und elfmal wiederholt wird. La Hoste wies 1996 ein gehäuftes Vorkommen des „7-repeat-allele“ bei ADHD-Patienten nach. Sunohara (1997), Swanson (1998) und Faraone (1999) konnten diese Ergebnisse bestätigen. Castellanos (1998) konnte allerdings kein gehäuftes Vorkommen des DRD4*7R-Allel bei ADHD finden.

Die bisher vorliegenden Arbeiten zur ADHD-Pathophysiologie lassen eine Störung im dopaminergen und noradrenergen System immer wahrscheinlicher werden. Mehrere Studien versuchten daher auch im peripheren Blut oder im Urin Hinweise auf eine gestörte Katecholaminhomöostase zu finden. Spivak (1999) konnte im peripheren Blut von ADHD-Patienten jedoch nur einen leicht erniedrigten Serotoninspiegel nachweisen. Die Konzentrationen von Norepinephrin und Dopa zeigten keine Unterschiede zur gesunden Vergleichsgruppe. Oades (1998) konnte bei 14 ADHD-Patienten im Plasma leicht erhöhte Werte von Norepinephrin und Epinephrin nachweisen, während im Urin deutlich erhöhte Konzentrationen von Norepinephrin und Serotoninmetaboliten vorlagen. Ebenso auffällige, allerdings signifikant erniedrigte Urinkonzentrationen von 3,4-Dihydroxyphenylglycol (ein Norepinephrinmetabolit) erbrachte die Studie von Hanna (1996).

1993 berichtete Hauser über ein gehäuftes Vorkommen von ADHD bei Patienten mit generalisierter Resistenz gegenüber Schilddrüsenhormon (GRTH). Bei dieser sehr seltenen Erkrankung kommt es aufgrund von Mutationen des Thyroid- β -Rezeptor-Gens zu einem verminderten Ansprechen des peripheren und des hypophysären Gewebes auf

Schilddrüsenhormon. In dieser Studie konnten bei 60% der an GRTH leidenden Patienten (49 Kinder und Erwachsene) auch das ADHD-Syndrom diagnostiziert werden. Doppelblind ließ sich eine Besserung der ADHD-Symptome bei Patienten mit GRTH durch Gabe von L-T3 erreichen (Weiss, 1997).

Mehrere Arbeiten konnten dagegen keine Assoziation zwischen ADHD und GRTH nachweisen und lehnen eine routinemäßige Kontrolle der Schilddrüsenparameter ab (Spencer, 1995; Elia, 1994; Toren, 1997; Valentine, 1997).

A. 1. 7. Genetik und Umwelteinflüsse

In den letzten Jahren wurden vermehrt Studien durchgeführt, die sich mit dem Einfluß genetischer Faktoren und der Umwelt auf das hyperkinetische Syndrom beschäftigen.

Untersucht wurden familiäre Häufung, Vererbbarkeit und Genlokalisierungen, sowie Zusammenhänge zwischen prä- und perinatalen Faktoren, sozialen Verhältnissen und dem gehäuftem Auftreten von ADHD.

Zahlreiche Untersuchungen zeigten ein vermehrtes Vorkommen psychopathologischer Erkrankungen, insbesondere ADHD, bei Eltern und anderen Familienangehörigen von betroffenen Kindern (Faraone, 1994; Hechtman, 1994; Lombroso, 1994; Pauls, 1990). Einige ältere Studien berichteten, daß ADHD 5 mal so häufig bei Verwandten von hyperaktiven Kindern diagnostiziert wurde, als in Vergleichsgruppen (Biedermann, 1986). Ebenso gehäuft festgestellt wurden bei den betroffenen Familien jedoch auch andere Verhaltensstörungen. Die hohe Komorbiditätsrate, die Abhängigkeit von retrospektiven Diagnosen und Fehlen einer kontrollierten Doppelblindstudie schränken jedoch die Verlässlichkeit dieser älteren Ergebnisse ein.

Neuere, methodisch verfeinerte Studien konnten eine höhere Inzidenz von ADHD bei Familienangehörigen ersten Grades männlicher ADHD-Patienten nachweisen (Faraone, 1994; Hudziak, 1993; Lombroso, 1994). Die Erkenntnisse bezüglich einer familiären Häufung von ADHD konnten sowohl auf Mädchen, als auch auf Jungen ausgeweitet werden (Faraone, 1991a; Faraone, 1995), wie auch auf Angehörige zweiten Grades (Faraone, 1996; Perrin, 1996).

Inwieweit diese familiäre Häufung auf Umwelteinflüssen gründet oder eine genetische Ursache hat, wurde in Zwillings- und Adoptionsstudien näher untersucht:

Bereits die frühen Zwillingsstudien mit kleinen Fallzahlen (Heffron, 1984; Lopez, 1965; Willerman, 1973) zeigten größere Konkordanz-Abweichungen zwischen eineiigen und zweieiigen Zwillingen. Mehrere größere und neuere Studien konnten ebenso höhere Konkordanzraten bei eineiigen Zwillingen feststellen, als bei zweieiigen (Edelbrock, 1995; Gillis, 1992; Levy, 1997; Sherman, 1997; Silberg, 1996; Stevenson, 1992; Thapar, 1995).

Bis heute steht der Nachweis einer Genlokalisierung für die Entstehung des ADHD aus. Auch oligogene und polygene Vererbungsmodi erscheinen möglich.

A. 1. 8. Therapie

Aufgrund der unterschiedlichen pathophysiologischen Erklärungsansätze des ADHD und der bisher nicht geklärten Ursache, finden sich verschiedene therapeutische Ansätze. Zu unterscheiden sind: Pharmakotherapie, Psychotherapie, Verhaltenstherapie und diätetische Therapie.

A. 1. 8. 1. Pharmakotherapie

Vor 60 Jahren wurde erstmals über eine deutliche Verbesserung des Verhaltens und der intellektuellen Leistung bei hyperkinetischen Kindern berichtet, wenn diese mit Amphetaminen behandelt wurden (Bradley, 1937).

Seitdem hat sich die Therapie des ADHD mit Psychostimulantien etabliert. Derzeit werden die Psychostimulantien Methylphenidat, Dextroamphetamin und Pemolin therapeutisch eingesetzt. In zahlreichen kontrollierten und zum Teil doppelblind durchgeführten Studien konnte der therapeutische Nutzen der Psychostimulantien nachgewiesen werden (Whalen, 1976; Spencer, 1996; Gillberg, 1997; Greenhill, 1999; Zeiner, 1999).

Als Wirkungsmechanismus wird eine dopaminerge und noradrenerge Wirkung im ZNS vermutet (Snyder, 1973; Shekim, 1979).

Lou (1984, 1989, 1990) konnte nachweisen, daß sich die bei ADHD-Patienten gefundene striatale und periventrikuläre Perfusionsstörung unter Methylphenidattherapie deutlich besserte.

Die Ansprechrate auf die Stimulantientherapie liegt bei ungefähr 70%, der Wirkungseintritt findet innerhalb einer Stunde statt.

Der therapeutische Nutzen liegt vor allem in einer Verbesserung der Verhaltensauffälligkeiten, der Aufmerksamkeit und der interpersonellen Interaktion. Während der Stimulantientherapie werden in der Regel bessere Schulleistungen erbracht, allerdings zeigt sich im Vergleich zur deutlichen Verhaltensbesserung eine geringere Verbesserung der intellektuellen Leistungen (Swanson, 1993; Elia, 1993).

Die mit Psychostimulantien zu erreichende, erfreuliche Milderung der ADHD-Symptome ist allerdings nur auf die Zeit der Gabe beschränkt. Nach Absetzen der Therapie findet sich bei fast allen Patienten wieder die gleich starke Ausprägung der Symptome wie vor Therapiebeginn. Zudem scheint die Psychostimulantientherapie keinen positiven Effekt auf die Langzeitprognose des ADHD auszuüben (Weiss, 1975). Ob sich durch eine konsequente Psychostimulantientherapie auch eine langfristige Verbesserung der Schulleistungen hinsichtlich Schulabschluß und Beruf erreichen läßt, konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Barkley, 1978).

Auch wenn die Psychostimulantientherapie insgesamt als sicher gilt, muß mit einer Reihe von Nebenwirkungen gerechnet werden:

- Ca. 80% der Behandelten zeigen eine Verminderung des Appetits, dies führt bei 10%-15% zu einem signifikanten Gewichtsverlust (Klein, 1992).
- Insomnie wird bei 3%-85% der behandelten Patienten berichtet (Klein, 1992).
- Erhöhung der Herzfrequenz und des Blutdrucks (Klein, 1992).
- Wachstumsretardierung; diese wird jedoch durch einen Wachstumsschub nach Therapiebeendigung wieder ausgeglichen (Safer, 1975).
- Entwicklung von motorischen oder verbalen Tics (Denckla, 1976).

Unter Pemolintherapie kam es seit 1975 zu 13 Fällen mit akutem Leberversagen (Food and Drug Administration, 1997).

Die häufige Befürchtung, daß durch eine längerfristige Psychostimulantientherapie das Risiko einer Medikamentenabhängigkeit entsteht, konnte bisher nicht bestätigt werden.

Die einfache Handhabung einer medikamentösen Therapie und die rasch nach Gabe erzielbaren Verhaltensbesserungen führten zu einer breiten Anwendung der Psychostimulantien in der Therapie des ADHD.

Um die Notwendigkeit einer längerfristigen Stimulantientherapie zu bestätigen, sollten immer wieder Auslaßversuche in die Therapie zwischengeschaltet werden. Nicht wenige Kinder bedürfen am Wochenende oder während der Schulferien keiner Therapie.

Aufgrund der Hemmung im Dopamin- und Norepinephrinmetabolismus wurde auch ein therapeutischer Nutzen der trizyklischen Antidepressiva beim ADHD postuliert. Tatsächlich konnte in zwei Studien ein positiver Effekt von Imipramin und Desipramin auf das Verhalten hyperkinetischer Kinder nachgewiesen werden (Quinn, 1975; Biedermann, 1989). Trotz ihrer längeren Halbwertszeit zeigte sich keine Überlegenheit gegenüber den Psychostimulantien (Quinn, 1975; Elia, 1990). Vorallem die deutlich stärkeren Nebenwirkungen der trizyklischen Antidepressiva mit sogar Todesfällen bei bis auf ADHD gesunden Kindern, verbieten derzeit einen routinemäßigen Einsatz (Biedermann, 1995; Varley, 1997).

Für den alpha-adrenergen Agonisten Clonidin konnte ebenfalls eine positive Wirkung auf die Symptome des ADHD nachgewiesen werden. Diese ist jedoch der Wirkung von Methylphenidat unterlegen (Hunt, 1990). Aufgrund fehlender Studien über den Nutzen und der Sicherheit einer Clonidintherapie bei ADHD-Patienten kommt dieses Medikament derzeit ebenfalls nicht zur routinemäßigen Anwendung.

A. 1. 8. 2. Verhaltenstherapie

Die bei Kindern mit ADHD postulierte Störung der Impulssteuerung legt die Anwendung von verhaltensmodifizierenden Therapien nahe. Bidder (1978) und Pelham (1998) berichten in ihren Studien über beachtliche Erfolge durch verhaltenstherapeutische Maßnahmen. Allerdings sind diese Therapieformen zeitlich und personell sehr aufwendig und bezüglich eines positiven Langzeiteffekts existieren bisher keine Daten.

A. 1. 8. 3. Psychotherapie

Diese scheint bei Kindern mit ADHD keinen Erfolg zu zeigen. Jedoch berichtet Satterfield (1981) über eine erfolgreiche Anwendung im Rahmen einer Familientherapie und der Kombination mit Psychostimulantien.

A. 1. 8. 4. Diätetische Behandlung

Die erfolgreiche Behandlung des ADHD durch die oligoantigene Diät wurde bereits im *Kapitel 1. 5. 1.* vorgestellt.

Prinzip der oligoantigenen Diät ist es, die Auswahl der verwendeten Nahrungsmittel auf ein Minimum zu beschränken und dabei nur Nahrungsmittel einzusetzen, die erfahrungsgemäß ein geringes Provokationspotential besitzen.

Die Diät muß also folgende Bedingungen erfüllen:

- Verwendung möglichst weniger verschiedener Nahrungsmittel
- Einsatz von Nahrungsmitteln mit bekannt niedrigem Unverträglichkeitspotential
- kein Mangel an essentiellen Nahrungsstoffen
- praktikable Beschaffung und Zubereitung der Zutaten
- schmackhafte und abwechslungsreiche Zubereitungsmöglichkeiten

Als 1980 erstmals Untersuchungen über die oligoantigene Diät durchgeführt wurden, kam zunächst die klassische oligoantigene Diät zum Einsatz (*Tab. 3*). Die klassische oligoantigene Diät setzte sich aus einer Fleischsorte, einem kohlenhydratreichen Nahrungsmittel, einer Frucht, verschiedenen Blattgemüsen und Wasser zusammen und ist frei von Farb- und Konservierungsstoffen, Milch, Milchprodukten und Getreide.

Für eine vollwertige Ernährung erfolgte die Substitution von Calcium und Vitaminen.

Im weiteren Verlauf zeigte sich, daß die strenge, klassische oligoantigene Diät mit einigen anderen Nahrungsmitteln kombiniert werden konnte, die ebenfalls nur sehr selten Reaktionen auslösten. Somit konnte ohne Minderung des Therapieerfolges eine für den Patienten wesentlich leichter zu akzeptierende Diät erstellt werden (Egger, 1985; Kaplan, 1989).

Während in der Vergangenheit verschiedene Diätkonzepte (z. B. phosphatarme Diäten) strengen wissenschaftlichen Überprüfungen nicht standhielten, konnte das Therapieprinzip der erweiterten oligoantigenen Diät durch eine Reihe groß angelegter, kontrollierter und z. T. doppelblind durchgeführter Studien verifiziert werden (Egger, 1985; Kaplan, 1989; Carter, 1993; Boris, 1994; Schulte-Korne, 1996).

Die erweiterte oligoantigene Diät besteht aus zwei Fleischsorten, Kartoffeln und Reis, verschiedenen Gemüsesorten, mehreren Früchten, Fett, Getränken, Gewürzen, Calcium und Vitaminen (*Tab. 3*).

	Klassische, oligoantigene Diät	Erweiterte oligoantigene Diät
Fleisch	Pute	je zwei Fleischsorten: (Lamm, Pute, Huhn, Truthahn)
Kohlenhydrate	Kartoffeln	Kartoffeln, Reis
Gemüse	Kohl, Rosenkohl, Blumenkohl, Spargel	Kohl, Rosenkohl, Blumenkohl, Spargel, Karotten, Sellerie, Pastinaken, Gurke, Markkürbis, Melone, Zwiebel, Lauch, Auberginen
Früchte	Bananen	Apfel, Birne, Banane, Aprikose, Pfirsich, Trauben, Ananas

Fett	Olivenöl	milchfreie Magarine, z. B. „Vitaquell“, Sonnenblumenöl
Getränke	Wasser	Fruchtsäfte der verwendeten Früchte, Leitungswasser, Soda, Quellwasser, Mineralwasser, Kräutertee
Gewürze	Salz	Salz, Pfeffer, Kräuter
Calcium	300 mg/d	300 mg/d
Multivitamine	Multibionta 15gtt	Multibionta 15gtt

Tab. 3

Die sehr eingeschränkte klassische oligoantigene Diät hat heute nur noch historische Bedeutung. Seit Mitte der achtziger Jahre wird ausschließlich die erweiterte oligoantigene Diät eingesetzt.

A. 1. 8. 4. 1. Hyposensibilisierung

Die oft aufwendige Zubereitung der für jedes Kind individuell erstellten Diät, die teilweise hohen Kosten und der schwierige Ersatz essentieller Nahrungsmittel, falls auf diese reagiert wurde, führte zur Entwicklung der Hyposensibilisierung bei Kindern mit nahrungsmittelinduziertem hyperkinetischen Syndrom. In einer doppelblind und placebo-kontrollierten Studie konnte Egger (1992) bei 16 von 20 Patienten eine Toleranz gegenüber dem vormals Symptome auslösenden Nahrungsmittel erreichen.

A. 1. 9. Prognose

In zunehmendem Maße konzentrieren sich kontrollierte Studien auch auf die Langzeitprognose des ADHD's, insbesondere wird die Frage gestellt, ob sich unbehandelte Kinder von Kindern, die medikamentös behandelt wurden, im späteren Leben unterscheiden. Bis zum Anfang der siebziger Jahre herrschte allgemein die Meinung, daß sich „das hyperkinetische Syndrom“ im Laufe des Erwachsenwerdens „auswachse“. So berichtet Laufer (1957) über eine deutliche Abnahme bis zum völligen Verschwinden der Symptome im Jugendalter. Niemals sei eine Symptompersistenz bis in das Erwachsenenalter beobachtet worden.

Die 25-Jahresverlaufsstudie von Menkes (1967) stützte diese Vorstellung, zeigte jedoch erstmals ein Fortbestehen von Koordinationsstörungen, visuomotorischen Schwierigkeiten und Sprachstörungen. Auch Borland (1976) fand zwar einen Rückgang der hyperkinetischen Symptome um 50% im Erwachsenenalter, doch wird in dieser Studie zum ersten Mal ein niedrigerer Sozial- und Berufsstatus der ehemals Hyperaktiven im Vergleich zu ihren Brüdern und Vätern aufgezeigt. Allerdings ist die Aussagekraft dieser Studien stark eingeschränkt, da es sich um retrospektive und oft unsystematische Studien handelte.

In den nun folgenden prospektiven Studien mit kürzerer Laufzeitdauer erkannte man, daß zwar die Hyperaktivität bei den ausschließlich Hyperaktiven deutlich abnahm, jedoch Aufmerksamkeitsdefizite und Impulsivität im Vierjahresverlauf bei Hyperkinetikern mit und ohne Störung des Sozialverhaltens persistierten. In Verbindung mit schlechten Schulleistungen führte die Symptomatik häufig zu anhaltenden Problemen mit niedrigem Selbstwertgefühl. Ein Unterschied zwischen früherer, erfolgreicher Stimulantientherapie und Spontanverlauf zeigte sich nicht (Mendelson, 1971; Stewart, 1973; August, 1984).

In einer 10-Jahres-Follow-up-Studie an 75 ehemals hyperaktiven Jugendlichen fanden sich diverse Abweichungen zur Kontrollgruppe. Die Impulsivität bestand unverändert fort, die Schulleistungen waren schlechter, die Schulabschlüsse niedriger und Schulausschlüsse waren häufiger (Weiss, 1979). Die negative Beeinträchtigung des späteren Berufsstatus durch ADHD in der Kindheit konnte auch in einer neueren Studie bestätigt werden (Mannuzza, 1997). Auch eine länger durchgeführte Therapie mit Psychostimulantien konnte an diesem Verlauf nichts ändern, wenngleich sich die behandelten Kinder unter Therapie besser anpassen konnten und den schulischen Anforderungen besser gerecht wurden (Barkley, 1978).

In einer 17 Jahre umfassenden Verlaufsstudie fand Mannuzza (1998) eine signifikant höhere Prävalenz antisozialer Störungen im Erwachsenenalter.

Bezüglich einer höheren Rate an Kriminalitätsdelikten finden sich keine einheitlichen Ergebnisse. Allerdings scheint das Risiko für dissoziales Verhalten und Drogenmißbrauch bei einer Persistenz der Kernsymptomatik in das Erwachsenenalter erhöht zu sein (Gittelman, 1985; Loeber, 1999).

Connors (1996) berichtet in einer Studie über einen deutlich erhöhten Nikotinkonsum bei erwachsenen ADHD-Patienten. Dieser könnte möglicherweise auch als eine Art Selbstmedikation aufgrund der indirekten dopaminergen Wirkung des Nikotins interpretiert werden.

In einer vom 9. bis 19. Lebensjahr verfolgten Feldstichprobe in Deutschland zeigte sich, daß von den im 8. Lebensjahr diagnostizierten Kindern mit hyperkinetischer Störung mit 18 Jahren keines mehr die Symptome der Hyperkinese zeigte, allerdings waren vierzig Prozent nun mit dissozialen Störungen auffällig. Sechzig Prozent waren bis zum 18. Lebensjahr vollkommen unauffällig geworden (Schmidt, 1991).

In allen Arbeiten zeigt sich, daß zwar mit zunehmendem Alter die Hyperaktivität abnimmt, oft aber nur um anderen Verhaltensstörungen Platz zu machen. Zudem zeigt die Mehrheit aller in der Kindheit von ADHD Betroffenen signifikante Beeinträchtigungen bezüglich des späteren sozialen und beruflichen Status.

Eine Verbesserung der Langzeit-Prognose durch eine konsequente medikamentöse Therapie im Kindesalter ist derzeit nicht erkennbar.

A. 2. VIP und der VIP-Rezeptor

A. 2. 1. Vasoaktives Intestinales Polypeptid

Als Claude Bernard 1856 in seinem Werk „Memoire sur Le Pancreas“ (Bernard, 1985) in zwei farbigen Illustrationen das Pankreas eines seit 36 Stunden fastenden Hundes als blaß und das eines gerade gefütterten Hundes als blutrot darstellt, mußte er sich auf eine rein deskriptive Beobachtung beschränken.

Heute, mehr als 140 Jahre später, weiß man, daß diese Beobachtung zumindest zum Teil durch die Existenz des Vasoaktiven Intestinalen Polypeptides zu erklären ist (Finke, 1986).

Said und Mutt konnten 1970 aus Dünndarmextrakten des Schweines ein neues Polypeptid isolieren. Da sich in den ersten biologischen Charakterisierungen eine starke periphere vasodilatatorische Wirkung vor allem im Mesenterialbereich zeigte, benannten sie das neu gefundene Peptid „vasoactive intestinal polypeptide“ (Said, 1970).

4 Jahre später konnte wiederum durch Said und Mutt die Aminosäuresequenz des von ihnen gefundenen Peptids aufgeklärt (Mutt, 1974) und durch Synthese des Peptids bestätigt werden (Bodanszky, 1974).

VIP des Schweines ist ein basisches, lineares Polypeptid aus 28 Aminosäuren (Oktacosapeptid). Die Primärstruktur von VIP ist in Teilsequenzen ähnlich der von Sekretin, Glucagon und Gastric Inhibitory Peptide (GIP). Daher wurden diese vier Peptide zur Gruppe II der Klassifikation nach Pearse (1974) zusammengefaßt. Mit der Entdeckung des Pituitary Adenylate Cyclase Activating Peptide (PACAP) fand man eine 68%ige Sequenzhomologie mit VIP, so daß die Pearse-Klassifikation erweitert werden mußte (Arimura, 1996).

Zunächst ging man davon aus, daß VIP in seiner Funktion der Gruppe der gastrointestinalen Hormone zuzuordnen wäre. Hierfür würde man jedoch eine physiologische Ausschüttung der Substanz in den Körperkreislauf fordern, die bei VIP nicht nachgewiesen werden konnte.

In den nun explosionsartig zunehmenden Publikationen über VIP, konnte VIP nahezu in allen Organen des Schweines und später auch des Menschen nachgewiesen werden. Als VIP im Gehirn und im peripheren Nervensystem entdeckt wurde, zeigte sich immer mehr, daß es sich bei dem neu gefundenen Peptid um ein Neuropeptid mit Eigenschaften eines Neurotransmitters und Neuromodulators handelt (Fahrenkrug, 1993).

A. 2. 1. 1. Biochemische Struktur des Vasoaktiven Intestinalen Polypeptids

Ursprünglich aus dem Schweinedarm isoliert, zeigte sich, daß die VIP-Aminosäuresequenz bei Schwein, Hund, Rind und Ratten mit der des Menschen identisch ist (Mutt, 1974; Bunnett, 1984; Carlquist, 1979; Dimaline, 1984).

Abb. 1 zeigt die VIP-Aminosäuresequenz des Menschen und ihre Strukturähnlichkeit mit Sekretin, Glucagon und einer Teilsequenz von Gastric Inhibitory Peptide (GIP) mit seinen ersten 29 Aminosäuren (Gruppe II der Klassifikation nach Pearse). Die mit VIP identischen Aminosäuresequenzen sind grau unterlegt.

VIP	Sekretin	Glucagon	GIP
His	His	His	Tyr
Ser	Ser	Ser	Ala
Asp	Asp	Gln	Glu
Ala	Gly	Gly	Gly
Val	Thr	Thr	Trh
Phe	Phe	Phe	Phe
Thr	Thr	Thr	Ile
Asp	Ser	Ser	Ser
Asn	Glu	Asp	Asp
Tyr	Leu	Tyr	Tyr
Thr	Ser	Ser	Ser
Arg	Arg	Lys	Ile
Leu	Leu	Tyr	Ala
Arg	Arg	Leu	Met
Lys	Asp	Asp	Asp
Gln	Ser	Ser	Lys
Met	Ala	Arg	Ile
Ala	Arg	Arg	Arg
Val	Leu	Ala	Gln
Lys	Gln	Gln	Gln
Lys	Arg	Asp	Asp
Tyr	Leu	Phe	Phe
Leu	Leu	Val	Val
Asn	Gln	Gln	Asn
Ser	Gly	Trp	Trp
Ile	Leu	Leu	Leu
Leu	Val	Met	Leu
Asn	NH ₂	Asp	Ala
NH ₂		Trh	Gln
		NH ₂	NH ₂

Abb. 1: Aminosäuresequenzen von VIP, Sekretin, Glucagon und GIP

A. 2. 1. 2. Biosynthese des Vasoaktiven Intestinalen Polypeptids

Das Gen für VIP ist auf Chromosom 6 (6q24) des menschlichen Genoms lokalisiert und besteht aus ungefähr 9000 Basenpaaren. Es beinhaltet sieben Exons, wobei jedes für eine bestimmte funktionale Domäne des VIP-Precursors oder die mRNA kodiert (Gozes, 1988). Die Intron/Exon-Konstellation des VIP-Gens ist sehr ähnlich mit der Intron/Exon-Struktur der „VIP related peptides“ (Gozes, 1986).

Die mRNA der cDNA des VIP-Gens beinhaltet die Struktur für VIP und PHI (Peptide histidine isoleucine) (Nishizawa, 1985). Posttranslational wird im Zellsoma zunächst ein aus 170 Aminosäuren bestehender Precursor synthetisiert. Durch Spaltung des Precursors kommt es zur Freisetzung des Polypeptids VIP und es erfolgt der Transport in Vesikeln zur Zellmembran der Nervenendigung. Bemerkenswerterweise kommt es trotz gemeinsamen Precursors nicht zu einer äquimolaren Freisetzung von VIP und PHI, was auf ein getrenntes Processing schließen läßt und nur zur Freisetzung des einen (VIP) bzw. des anderen Peptids (PHI) führt.

Die Aktivierung des VIP-Gens und die damit verbundene Synthese von VIP ist derzeit Gegenstand der Forschung. Man weiß, daß Steroidhormone, Protein hormone (Prolactin, HCG, TRH) und cholinerge Neurotransmitter die VIP-Genexpression beeinflussen (Balsa, 1996; Chew, 1997; Kristensen, 1997). Weiterhin scheint es einen Regulierungsmechanismus auf Transkriptionsebene zu geben, der durch cAMP und Proteinkinase C gesteuert wird (Hayakawa, 1984; Pruss, 1985). Neue Arbeiten weisen jedoch darauf hin, daß der Mechanismus der VIP-Genregulation selbst innerhalb eines physiologischen Systems (z. B. Gastrointestinaltrakt) unterschiedlich ist (Pearson, 1993).

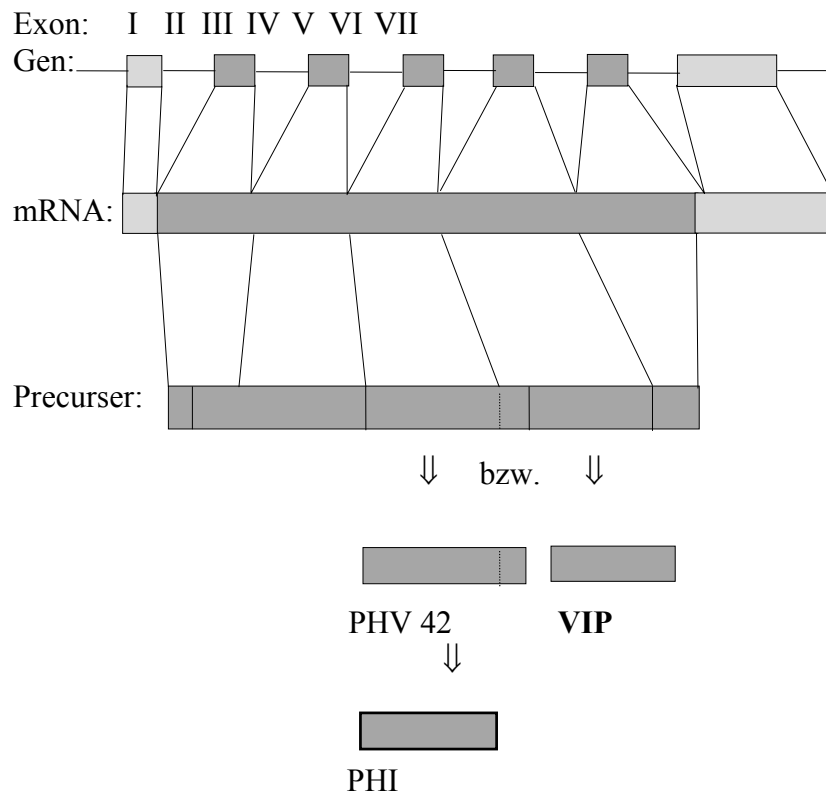


Abb. 2: Schematische Darstellung der Beziehung zwischen VIP-Gen, der mRNA, dem Precursor und dem Endprodukt. Von den sieben Exons enthalten fünf kodierende Sequenzen (dunkelgrau unterlegt) für VIP und PHI.

A. 2. 1. 3. Physiologische Freisetzung und Metabolismus des Vasoaktiven Intestinalen Polypeptids

VIP wird im Soma der Nervenzelle synthetisiert und an den Nervenenden in Vesikeln gespeichert. Bisher konnten mehrere Mechanismen nachgewiesen werden, die zur Freisetzung von VIP führen.

Werden gastrointestinales Gewebe innervierende Nerven oder das VIP-Nervenfasern enthaltende Gewebe direkt stimuliert, wird VIP aus der Nervenendigung freigesetzt (Fahrenkrug, 1978; Bloom, 1980; Grider, 1985). Ebenso konnte durch elektrische Reizung der glatten Muskulatur des unteren Ösophagusphinkters und durch Stimulierung des N. vagus die Freisetzung von VIP nachgewiesen werden (Bloom, 1980; Biancani, 1984). Man sah, daß die Menge freigesetzten VIP's proportional zur Frequenz und Intensität der Stimulierung war. Die Blockierung der Freisetzung von VIP durch Tetrodotoxin und Hexamethonium, läßt eine Verbindung der VIP-Nervenfasern mit dem nikotinergen cholinergen Nervensystem vermuten (Grider, 1986).

Von folgenden Substanzen ist eine Stimulierung bzw. Verstärkung der VIP-Freisetzung beim Menschen bekannt:

- Cholinerge Agonisten z.B. Neostigmin (Bitar, 1980)
- Serotonin (Shimatsu, 1982)
- Dopaminerge Agonisten (Goiny, 1986)
- Prostaglandine (Shimatsu, 1983)
- Stickstoffmonoxid (NO) (Allescher, 1996).

Wegen des hohen „first pass effect“ in der Leber ist die Plasmakonzentration von VIP niedrig (<20pmol/l) und spielt im physiologischen Rahmen nur eine geringe Rolle. Leichte Plasmakonzentrationserhöhungen konnten nach intraduodenaler Fett-, HCl-, Ethanol-, Kohlenhydrat- und Wasserbelastung beobachtet werden ((Schaffalitzky-de-Muckadell, 1977; Pedersen-Bjergaard, 1996). Deutlich höhere VIP-Konzentrationen lassen sich im Portalvenenblut nachweisen.

Eine pathologische Erhöhung der VIP-Plasmakonzentration findet sich beim Pankreas-Cholera-Syndrom (Bloom, 1978).

VIP wird im menschlichen Organismus sehr schnell metabolisiert, so daß die Halbwertszeit nur eine Minute beträgt (Domschke, 1978). Ursächlich dafür ist zum einen der Abbau in der Leber und zum anderen eine Internalisierung und nachfolgende Degradation des an seinen Rezeptor gebundenen Peptids (Misbin, 1982; Luis, 1986).

A. 2. 1. 4. Physiologische Wirkung des Vasoaktiven Intestinalen Polypeptids auf zellulärer Ebene

Nach der Freisetzung aus der Nervenzelle bindet VIP an die spezifischen VIP-Rezeptoren, die an der Zelloberfläche der Zielzelle gelegen sind. Diese Bindung ist spezifisch, sättigbar, reversibel und temperaturabhängig. Vorallem durch Studien am unteren Ösophagussphinkter und am Sphinkter Oddi konnte die VIP vermittelte Signaltransduktion aufgeklärt werden. Alle Arbeiten zeigen eine Beteiligung von second messenger-Systemen.

Wirkt VIP als Inhibitor (Relaxation der glatten Muskulatur) kann dies auf zwei Wegen geschehen: Durch die Ligand-Rezeptorbindung an der Zelloberfläche wird ein G-Proteinkomplex aktiviert, der die Adenylatzyklase aktiviert und damit zu einer intrazellulären cAMP-Erhöhung führt oder es kommt zur Aktivierung der Guanylzyklase und somit zur Freisetzung von cGMP. Sowohl cAMP als auch cGMP sind bekannte second messenger bei der neuronal induzierten Relaxation glatter Muskulatur.

Im Gegensatz dazu sind IP₃ und DAG bei der Kontraktion glatter Muskulatur als second messenger involviert.

Neuere Studien weisen allerdings auf ein komplexes Zusammenspiel verschiedener second messenger (cAMP, cGMP, IP₃) bei der VIP induzierten Signaltransduktion hin (Ignarro, 1987; Swewczak, 1990; Ito, 1990; Baird, 1990; Fiscus, 1991; Maurice, 1990).

A. 2. 1. 5. Vorkommen und Wirkung des Vasoaktiven Intestinalen Polypeptids im menschlichen Organismus

Zunächst wurde VIP bei seiner Erstentdeckung 1972 im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen, was zur Namensgebung führte. Inzwischen weiß man, daß das VIP-Gen in den Neuronen sowohl des peripheren, als auch des Zentralen Nervensystems exprimiert wird und kaum ein Organ ohne Nachweis VIPerger Nervenfasern verblieben ist.

VIP konnte als nonadrenerger-noncholinerg Neurotransmitter außer im Gastrointestinaltrakt und ZNS, auf die gesondert eingegangen wird, bisher in folgenden Organen bzw. Organsystemen nachgewiesen werden:

- Kardiovaskuläres System:
Dilatation der Koronararterien, positiver inotroper und chronotroper Effekt (Unwin, 1987; Christophe, 1984; Smitherman, 1989; Popma, 1990).
- Respiratorisches System:
Bronchodilatation, Relaxation der Pulmonal- und Bronchialarterien (Dey, 1981; Altieri, 1983).
- Urogenitaltrakt:
multiple Effekte, vorallem Steigerung der Durchblutung an Nieren, Ureteren, Uterus, Tuben, Ovarien, Vagina, Prostata und Penis (Barajas, 1983; Calam, 1983; Calam, 1984; Willis, 1981; Graf, 1996).
- Endokrine Organe:
Sekretion der Hypophysenhormone (TSH, LRH), Schilddrüsenhormonsekretion und Verstärkung der TSH-Wirkung (Ahren, 1980; Hammond, 1993; Toccafondi, 1984), in Nebenniere, Hoden und Ovarien wahrscheinlich Stimulierung der Steroidsynthese. Stimulierung der Insulin- und Glucagonsekretion im Pankreas (Fahrenkrug, 1987; Huffman, 1988).
- Hemmung der Thrombozytenaggregation (Cox, 1984; Park, 1996).
- Modulation im Immunsystem (Leceta, 1996).

A. 2. 1. 5. 1. Vorkommen und Wirkung des Vasoaktiven Intestinalen Polypeptids im Gastrointestinaltrakt

Immunhistochemische Untersuchungen haben ein weitverbreitetes Vorkommen von VIP bzw. VIPergen Nervenfasern im Gastrointestinaltrakt gezeigt. VIP läßt sich in den intestinalen Nervenplexus, Nervenzellperikaryen, Nervenzellfasern und Nervenzellendigungen nachweisen. Die höchsten Gewebekonzentrationen von VIP im menschlichen Gastrointestinaltrakt konnten im Dünndarm und Colon descendens nachgewiesen werden, wobei VIP in der Mucosa und in der Submucosa gleich verteilt ist (Chayvialle, 1982).

Ca. 45% der Perikaryen des Plexus submucosus sind VIP-immunreaktiv, während im Plexus myentericus nur 2-7% der Nervenzellen VIP enthalten (Ferri, 1983; Wattchow, 1988). Die aus dem Plexus submucosus entspringenden Nervenfasern bilden ein dichtes Netzwerk in der Lamina propria. Zahlreiche Nervenfasern ziehen lumenwärts bis zur oberflächlichsten Schicht der Mucosa, umgeben die epithelialen Krypten und Villi und erreichen so die Enterozyten (Larsson, 1976).

Ein Teil der Nervenfasern aus dem Plexus myentericus mündet an gleicher Stelle sofort in die Ring- und zu einem geringeren Anteil in die Längsmuskulatur (Burleigh, 1990), der andere Anteil zieht im Plexus bis zu 15 mm analwärts und innerviert dann die Muskulatur (Costa, 1983).

Daß sich weder durch Vagotomie noch durch Sympathektomie die Anzahl bzw. Aktivität der VIPergen Nervenfasern verringern ließ, führte zum Begriff des „intrinsischen Nervensystems“ (Larsson, 1978). Es konnten jedoch auch VIPerge Nervenfasern nachgewiesen werden, die zum Ganglion coeliacum und Ganglion mesentericum inferior ziehen und somit eine übergeordnete sympathische Beeinflussung vermuten lassen (Costa, 1983).

Ebenso konnte gezeigt werden, daß ein gewisser Teil VIP-immunreaktiver Nervenfasern prä- und postganglionär vagalen Ursprungs ist (Kirschgessner, 1989).

Die von Said und Mutt bereits bei der Entdeckung von VIP beobachteten physiologischen Wirkungen von VIP, konnten in zahlreichen Studien bestätigt und erweitert werden. Am menschlichen Dünndarm konnte die Funktion von VIP durch Studien von Krejs (1980), Davis (1981) und Wolosin (1989) weiter aufgeklärt werden.

Wirkung von VIP auf die Hydroelektrolytsekretion im Dünndarm des Menschen:

- Verminderung der passiven Natrium- und Chloridresorption
- Absinken der Wasserresorption
- Stimulierung der Bicarbonatsekretion, Verminderung der aktiven Bicarbonatabsorption
- Erhöhung der aktiven Chloridsekretion:
An menschlichen Colonepithelzellen konnte ein an der basolateralen Zellmembran gelegenes Na^+ , K^+ , Cl^- Kotransport-System, das die lumenseitige Chloridsekretion beeinflusst, nachgewiesen werden (Dharmasathaphorn, 1985). Ob dieser Mechanismus auch für den Dünndarm existiert, ist bisher nicht erwiesen.
- Erhöhung der lumen negativen Potentialdifferenz.

Wirkung von VIP auf die glatte Muskulatur im Dünndarm des Menschen:

Durch eine Erhöhung des intrazellulären cAMP's führt VIP zur direkten Relaxation der glatten Darmwandmuskulatur und der Sphinkter (Binder, 1980). Da die glatte Muskulatur der Darmwand einem kontinuierlich kontrahierend wirkenden neuronalen Stimulus ausgesetzt ist, kommt es durch die inhibitorische Wirkung von VIP zur Muskelrelaxation. Man beobachtete, daß VIP durch Darmwanddistension aus den Neuronen sezerniert wird und zu einer analwärts führenden Muskelrelaxation führt, so daß man davon ausgeht, daß VIP in den Mechanismus des intestinalen Peristaltikreflexes eingebunden ist (Grider, 1989).

Neuere Studien postulieren zwar weiterhin eine führende Rolle von VIP bei der Relaxation der glatten Darmwandmuskulatur, jedoch wurde vorallem mit der zunehmenden Funktionscharakterisierung von NO ein komplexes Zusammenspiel verschiedener noncholinерger-nonadrenerger Neurotransmitter (NANC) im Gastrointestinaltrakt evident (McKirdy, 1988; Brookes, 1993).

Einfluß von VIP auf die gastrointestinale Durchblutung:

VIP führt zu einer Steigerung der Durchblutung durch Vasodilatation (Biber, 1971; Eklund, 1980; Synnerstad, 1998). Dies zeigt sich vorallem in einer Erhöhung des arteriellen Blutflusses in der Arteria gastrica sinistra und Arteria gastroduodenalis (Thulin, 1984).

A. 2. 1. 5. 2. Vorkommen und Wirkung des Vasoaktiven Intestinalen Polypeptids im Zentralen Nervensystem

Wurde VIP nach seiner Entdeckung zunächst als ein nur im Gastrointestinaltrakt vorkommendes Hormon betrachtet, konnte VIP 1976 erstmals im Zentralen Nervensystem der Maus und der Ratte nachgewiesen werden (Larsson, 1976). VIP wurde in radial angeordneten, bipolaren intrakorticalen Neuronen lokalisiert. Weitere Arbeiten wiesen VIP neben dem Cortex auch im Hypothalamus und im limbischen System nach (Fahrenkrug, 1978; Loren, 1979). Ebenso konnte gezeigt werden, daß die intrazerebralen Blutgefäße durch VIP innerviert werden (Larsson, 1976).

Physiologische Wirkung von VIP im ZNS:

- Stimulierung der Glycogenolyse (Magistretti, 1984)
- Förderung des Glucosemetabolismus (McCulloch, 1983)
- Steigerung der zerebralen Durchblutung durch Vasodilatation (Bevan, 1984).

A. 2. 2. Der VIP-Rezeptor

Der VIP-Rezeptor gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und besitzt sieben transmembranöse Domänen (Couvineau, 1993).

Man unterscheidet zwei verschiedene VIP-Rezeptoren, den VIP₁-Rezeptor und den VIP₂-Rezeptor molekulargenetisch und in ihrer Aminosäuresequenz, die nur zu 50% identisch ist (Sreedharam, 1993).

Der VIP₁-Rezeptor besteht aus 457 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 52 kDa. Er entspricht dem PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide) II-Rezeptor und besitzt die gleiche Affinität zu VIP wie zu dem ebenfalls zur Glucagon-Sekretin-VIP-Familie gehörenden Peptid PACAP.

Um eine einheitliche und klare Nomenklatur zu erreichen, wird der früher als VIP₁-Rezeptor bezeichnete Rezeptortyp nun zunehmend als VPAC₁-Rezeptor geführt (Harmar, 1998).

Das Rezeptorgen ist auf dem Chromosom 3p22 lokalisiert. Der VPAC₁-Rezeptor wurde in der Lunge, in der Leber, im Gastrointestinaltrakt, im ZNS, im Cortex und im Hippocampus nachgewiesen (Sreedharam, 1995).

Der VIP₂-Rezeptor besteht aus 438 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 49 kDa. Er besitzt ebenfalls die gleiche Affinität zu VIP und PACAP, wobei der potenteste Ligand das Peptid Helodermin ist. Das Rezeptorgen ist auf dem Chromosom 7q36.3 lokalisiert (Mackay, 1996). Dieser Rezeptor wird nun in der neueren Literatur VPAC₂ genannt. Der VIP₂-Rezeptor wird auf Lymphoblasten, Monozyten, Lungencarcinomzellen und im Zentralen Nervensystem (Hippocampus, Thalamus und Cerebellum) exprimiert (Adamou, 1995).

Die durch die Bindung von VIP an den Rezeptor ausgelöste Ligand-Rezeptorinteraktion und die folgende Signaltransduktion wurden bereits im *Kapitel A. 2. 1. 4.* ausführlich beschrieben. An den VIP-Rezeptoren können auch Agonisten und Antagonisten, z. B. Wachstumshormon-Releasing-Faktoren (Pandol, 1986) oder VIP-Fragmente (Turner, 1986) binden, die den VIP-Bindungs-Effekt verstärken oder hemmen können. Die Wirkung der Agonisten bzw. der Antagonisten ist abhängig von der Spezies und der Gewebeart, weswegen auf eine gewisse Heterogenität der VIP-Bindungen geschlossen werden kann (Christophe, 1986; Rosselin, 1980).

Die Stärke der Wirkung des freigesetzten VIPs an der Zielzelle kann über verschiedene Mechanismen auch noch am VIP-Rezeptor moduliert werden. So können einige Zielzellen die Sekundär-Konfiguration des Rezeptors und damit die Bindungszahl verändern (Christophe, 1986).

Bei stetiger VIP-Exposition kommt es zu einer Toleranzentwicklung des Rezeptors mit Erniedrigung der Rezeptor-Anzahl und einer verminderten oder sogar gänzlich fehlenden Signaltransduktion bei erneuter VIP-Ausschüttung. Diese Effekte konnten bei den verschiedensten VIP-Wirkungen unter anderem bei der Glykogenolyse (Rousset, 1981), der Gefäßmuskelrelaxation (Ganz, 1986) und bei T-Lymphozyten (Ottaway, 1984) beobachtet werden. Die chemische Desensibilisierung des VIP-Rezeptors ist bei der Aktivierung des Katecholamin-Rezeptors vom Typ α_1 bekannt, bei dessen Aktivierung über Phosphorylierungsprozesse schließlich die C-Kinase stimuliert wird. Diese mindert die VIP-Wirkung auf c-AMP (Quilliam, 1985).

Durch Rosselin (1988) wurden entscheidende Erkenntnisse über die VIP-Rezeptorregulation erbracht. Bei 37°C kommt es bereits drei Minuten nach Bindung von VIP an den VIP-Rezeptor zur Internalisierung des Ligand-Rezeptorkomplexes. Zu diesem Zeitpunkt besteht funktionell und wahrscheinlich auch strukturell keine Verbindung mehr zur Adenylat-Cyclase. Der Rezeptor bleibt in seiner Konfiguration bei der Internalisierung unverändert, ebenso bleibt VIP noch an den Rezeptor gebunden. Erst dann kommt es zu einer zunehmenden Lösung vom Rezeptor und der Rezeptor wird in Endosomen aufgenommen. Ca. 70% der internalisierten Rezeptoren erscheinen nach 10 Minuten „recycled“ erneut an der Zelloberfläche und werden wieder an die Adenylatcyclase gebunden, die restlichen 30% werden in Lysosomen abgebaut (Abb. 3).

Die Regulation der Neusynthese der VIP-Rezeptoren ist unbekannt.

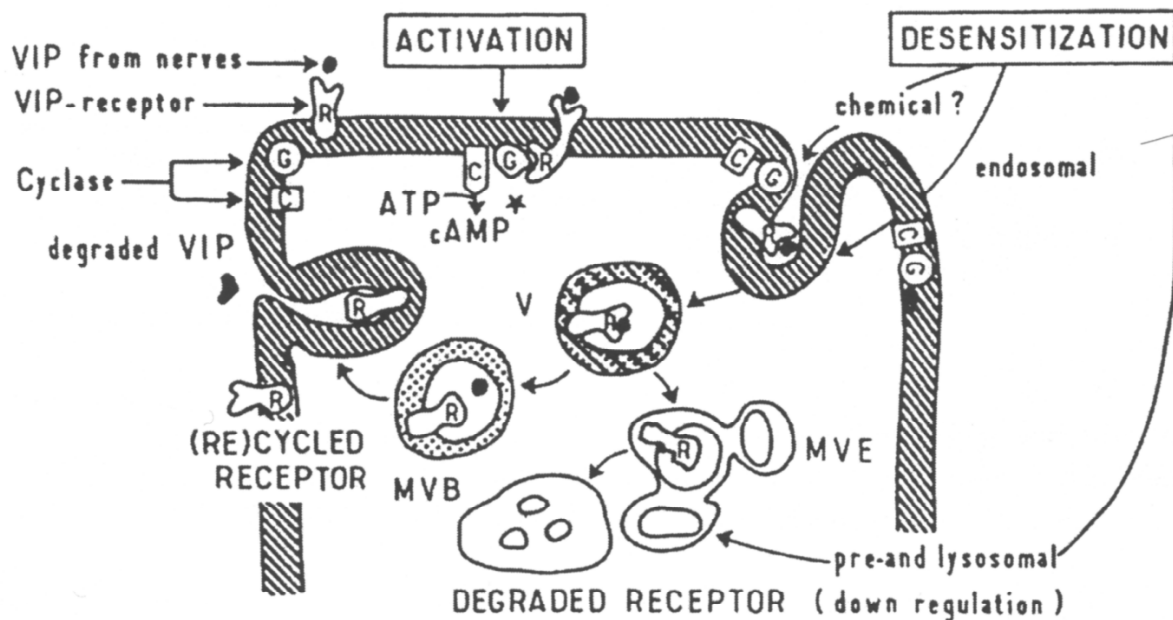


Abb. 3: Regulation des VIP-Rezeptors (aus Rosselin, 1988)

VIP-Rezeptoren konnten mittlerweile wie VIP selbst, in fast allen Organen nachgewiesen werden.

Im gesamten Gastrointestinaltrakt lassen sich, wenn auch in unterschiedlicher Dichte, VIP-Rezeptoren nachweisen. In Autoradiographiestudien mit [¹²⁵J]-markiertem VIP an humanem Darmgewebe fanden sich die höchsten Konzentrationen der VIP-Rezeptoren im Duodenum und Jejunum (Zimmerman, 1989; Korman, 1989).

Im Duodenum befinden sich die VIP-Rezeptoren vor allem in der luminalen Mucosa. In keinem Bereich des gesamten Gastrointestinaltrakts findet sich eine höhere Rezeptordichte als in der duodenalen luminalen Mucosa. Ebenfalls weisen die basale Mucosa und die Muscularis mucosae hohe Rezeptordichten auf. Geringere Konzentrationen an VIP-Rezeptoren liegen in der glatten Muskulatur, in der Ringmuskulatur, um Arteriolen und im Plexus myentericus vor. Die Längsmuskulatur weist die geringste Rezeptordichte im Duodenum auf (Zimmerman, 1989).

Ein ähnliches Verteilungsmuster findet sich im Jejunum. Im Colon konnten VIP-Rezeptoren in der Mucosa, in der Muscularis mucosae, Submucosa, in der Ring- und Längsmuskulatur, im Plexus myentericus, in der glatten Muskulatur der Arterienwände und in Lymphknoten nachgewiesen werden (Zimmermann, 1989). Korman (1989) kam bei seinen Untersuchungen bis auf den fehlenden Nachweis in glatter Muskulatur und Lymphknoten, zu den gleichen Ergebnissen.

Bemerkenswert ist, daß die VIPergen Fasern im Gegensatz zu den korrespondierenden Rezeptoren vor allem in der Lamina propria, im Plexus submucosus und Plexus myentericus vorkommen (Kormann, 1989; Costa, 1987; Ferri, 1983).

B. Material und Methoden

B. 1. Auswahl der Patienten

Im Rahmen des vom Bundesministerium für Gesundheit geförderten Modellprojektes „Ernährung und Verhalten“ wurden zum Zeitpunkt dieser Studie in der von Prof. Egger geleiteten Sprechstunde „Ernährung und Verhalten“ im Dr. v. Haunerschen Kinderspital 70 Patienten mit nahrungsmittelinduziertem hyperkinetischen Syndrom betreut.

Für unsere Studie wurden aus diesem Patientenpool 14 Patienten ausgewählt.

Die Auswahl der Patienten erfolgte nach folgenden Kriterien:

1. Diagnose des hyperkinetischen Syndroms entsprechend den Kriterien des „Diagnostischen und Statistischen Manuals psychischer Störungen“ (DSM-3R) und der „International Classification of Diseases 10“ (ICD 10). Diese wurden bereits im Anfangsteil der Arbeit vorgestellt und sollen hier deshalb nicht mehr weiter besprochen werden.
2. Vorliegen eines nahrungsmittelinduzierten hyperkinetischen Syndroms mit:
 - a, Normalisierung oder definierbarer Besserung der Hyperaktivität und des Aufmerksamkeitsdefizits (Conners Skalen, Continuous Performance Test, Matching Familiar Figure Test) unter oligoantigener Diät.
 - b, Wiederauftreten der Symptome unter Einnahme bestimmter Nahrungsmittel und Remission der Symptome unter Vermeidung dieser Nahrungsmittel.
 - c, Reproduzierbarkeit der Verhaltensbeeinflussung durch bestimmte Nahrungsmittel während dreimaliger Exposition.
3. Die Beschaffenheit der provozierenden Nahrungsmittel musste so sein, daß für den einzelnen Patienten nicht provozierende Nahrungsmittel zur Verfügung standen, die hinsichtlich des Energiegehalts, der Verteilung von Protein, Kohlenhydrat, Fett, der Osmolarität und des Volumens vergleichbar waren.
4. Die klinische Indikation zur Dünndarmsaugbiopsie zum Ausschluß einer silenten Zöliakie mußte bestehen.
5. Patienten mit zusätzlichen Erkrankungen, die nicht dem Formenkreis des nahrungsmittelinduzierten hyperkinetischen Syndroms zugehörten, wurden aus der Studie ausgeschlossen.
6. Keine medikamentöse Therapie des ADHD mit Psychostimulantien (Methylphenidat).

B. 2. Durchführung der oligoantigenen Diät

Das Prinzip der oligoantigenen Diät und ihre in kontrollierten Studien nachgewiesene Wirksamkeit zur Behandlung des hyperkinetischen Syndroms wurden bereits in den *Kapiteln A. 1. 5. 1. und A. 1. 8. 4.* vorgestellt.

Bei allen Studienteilnehmern handelte es ausschließlich um ambulante Patienten. Die klinische Anbindung erfolgte durch regelmäßige Vorstellungen in der Sprechstunde „Ernährung und Verhalten“. Zudem wurde durch die betreuenden Ärzte und Diätassistenten der Sprechstunde telephonischer Kontakt mit den Eltern und den betreuenden Lehrern bzw. Kindergärtnerinnen aufrecht erhalten.

Durch die ambulante Betreuung ergaben sich folgende Vorteile:

- Durch die vertraute häusliche Umgebung konnten Nahrungsmittelleffekte auf das Verhalten des Patienten sicherer erfaßt werden.
- Eine schmackhafte, individuelle Zubereitung der oligoantigenen Diät war im häuslichen Rahmen eher gegeben, als dies in einer Krankenhausgroßküche möglich gewesen wäre.
- Häufig war es möglich, daß die gesamte Familie an der Diät teilnahm und so ein Sonderstatus des Patienten vermieden werden konnte.

Die Diätbehandlung wurde in drei Phasen unterteilt:

B. 2. 1. Die erste Phase: erweiterte oligoantigene Diät

Wie bereits unter A. 1. 8. 4. erwähnt, wurde zur Identifizierung der provozierenden Nahrungsmittel in unserer Studie die erweiterte oligoantigene Diät verwendet.

Die ausgewählten Patienten mußten für 4 Wochen die unter A. 1. 8. 4. beschriebene erweiterte oligoantigene Diät einhalten (Tab. 4).

erweiterte oligoantigene Diät	
Fleisch	je zwei Fleischsorten: (Lamm, Pute, Huhn, Truthahn)
Kohlenhydrate	Reis, Kartoffeln
Gemüse	Kohl, Rosenkohl, Blumenkohl, Spargel, Karotten, Sellerie, Pastinaken, Gurke, Melone, Markkürbis, Zwiebel, Lauch, Auberginen
Früchte	Apfel, Birne, Banane, Aprikose, Pfirsich, Trauben, Ananas
Fett	milchfreie Margarine, z. B. „Vitaquell“, Sonnenblumenöl

Getränke	Fruchtsäfte der verwendeten Früchte, Leitungswasser, Soda, Quellwasser, Mineralwasser, Kräutertee
Gewürze	Salz, Pfeffer, Kräuter
Calcium	300 mg/d
Multivitamine	Multibionta 15gtt

Tab. 4

Das Verhalten der Kinder unter der Diät wurde von den Eltern täglich, von den Lehrern bzw. Kindergärtnerinnen in regelmäßigen Abständen anhand der Conners-Verhaltensskalen dokumentiert.

Zeigte sich anamnestisch und anhand der Conners-Skalen eine deutliche Besserung der ADHD-Symptome, wurden die Patienten der Reintroduktionsphase zugeführt.

Konnte durch die oligoantigene Diät keine signifikante Verhaltensbesserung erreicht werden, mußten drei Ursachen in Erwägung gezogen werden:

1. Nahrungsmittel hatten keinen Einfluß auf die Symptome des ADHD.
2. Die Diät wurde nicht eingehalten.
3. Die oligoantigene Diät selbst enthielt Nahrungsstoffe, die das hyperaktive Verhalten auslösten. Zum Ausschluß dieser Ursache wurde die Basisdiät durch eine zweite ebenfalls als inert geltende Diätzusammensetzung ersetzt, die wiederum für 3-4 Wochen eingehalten wurde (Tab. 5).

Zweite oligoantigene Diät	
Fleisch	Rind, Schwein
Kohlenhydrate	Mais
Gemüse	Blattgemüse, Pastinaken
Früchte	Birnen, Avokado, Mango
Fett	Sonnenblumenöl

Getränke	Wasser
Gewürze	Salz
Calcium	300 mg/d
Multivitamine	Multibionta 15ggt

Tab. 5

Ließ sich auch durch die zweite oligoantigene Diät keine signifikante Verhaltensbesserung trotz zuverlässiger Compliance erreichen, konnte ein nahrungsmittelinduziertes hyperkinetisches Syndrom ausgeschlossen werden.

B. 2. 2. Die zweite Phase: Reintroduktion

Patienten, deren Verhalten sich unter der erweiterten oligoantigenen Diät normalisiert oder deutlich und definierbar gebessert hatte, traten in die Phase der sequentiellen Reintroduktion ein. Ziel der Reintroduktionsphase war es, provozierende Nahrungsmittel zu identifizieren. Alle fünf Tage wurde ein vorher in der oligoantigenen Diät nicht enthaltenes Nahrungsmittel der Diät zugesetzt. Dieses Nahrungsmittel mußte nun über fünf Tage in normaler Menge eingenommen werden (Tab. 6).

Reintroduktionsphase	
Huhn	frisch oder gefroren
Hafer	Haferschleim, Haferkekse
Rind	frisch oder gefroren
Weizen	Vollkornweizen, Nudeln (eifrei)
Roggen	Vasa®
Hefe	Vollkornbrot ohne Milch- oder Sojazusätze und ohne Konservierungsstoffe
Kuhmilch	pasteurisierte Milch, Joghurt ohne Zusätze

Käse	farbstofffreie Hartkäsesorten
Ei	1 frisches Ei pro Tag in beliebiger Zubereitung während des Austestens, später maximal 3 Eier pro Woche
Fisch	frisch oder tiefgefroren, nicht aus der Dose, nicht geräuchert
Zitrusfrüchte	Früchte oder Säfte (ohne Zusätze)
Tomaten	frisch oder püriert (ohne Zusätze)
Schwein	frisch oder tiefgefroren
Zucker	Rübenzucker
Schokolade	bei Milchunverträglichkeit milchfreie Schokolade, z.B. Cote d'Or, Kakaopulver
Malz	Wheatabix, Rice Crispies, Cornflakes
Tee	
Farbstoffe	in Form von Speisefarben als Pulver (5-50 mg/d) oder als Gummibärchen (wenn Zucker problemlos)
Benzoat	Corned beef, Würste, Squash, kann auch als Pulver der Nahrung zugesetzt werden (5-50 mg/d)
Sodiumglutamat	Suppenwürfel, z.B. Knorr®

Tab. 6

Konnte nach dem Hinzufügen eines vorher im Diätplan nicht enthaltenen Nahrungsstoffes ein Wiederauftreten oder eine Verschlechterung der Symptome beobachtet werden, wurde dieser Nahrungsstoff als provozierendes Nahrungsmittel eingestuft und aus dem Diätplan entfernt. In der Regel konnte ein Nahrungsmittel zwischen einigen Stunden und 3-4 Tagen nach Einführung als provozierend erkannt werden.

Wenn ein Nahrungsmittel keinen negativen Einfluß auf das Verhalten hatte, wurde es fest in den Diätplan übernommen.

Zu jedem Zeitpunkt der Reintroduktionsphase wurde darauf geachtet, die Reihenfolge der wieder einzuführenden Nahrungsmittel dem Wunsch des Patienten und der Forderung nach einer ausgewogenen Nahrungszusammensetzung anzupassen

Die Austestung künstlicher Farb- und Konservierungsstoffe, die in vielen Nahrungsmitteln enthalten sind, erfolgte durch gefärbte Süßigkeiten (z. B. Gummibärchen) oder gefärbte Limonaden. Zuvor mußte natürlich die Unverträglichkeit der Trägersubstanz ausgeschlossen worden sein.

Die als provozierend erkannten essentiellen Nahrungsmittel wurden wie aus *Tab. 7* ersichtlich ersetzt.

Ersatz für provozierende Nahrungsmittel	
Kuhmilch	pasteurisierte Ziegenmilch, Soja (Humana SL®, Milupa Som®, Multival Plus®), Pregestemil®, Alfare®, Pregumin®
Käse	Ziegenmilch- oder Schafsmilchkäse in jeder Form. Wegen des hohen Salzgehaltes vorher einige Stunden in Wasser eingelegt
Weizen	Roggen, Hafer, Mais, Gerste, Hirse
Ei	Methylcellulose (zum Backen), Enteneier
Rübenzucker	Rohrzucker, Glucose, Fructose
Schokolade	Johannisbrot
Orangensaft	schwarzer Johannisbeer- oder Ananassaft

Tab. 7

B. 2. 3. Die dritte Phase: Reproduzierbarkeit

Alle Patienten dieser Studie, bei denen in der zweiten Phase (Reintroduktion) ein oder mehrere Nahrungsmittel als provozierend identifiziert werden konnten, durchliefen nun die dritte Phase.

Ziel der dritten Phase war es, die als provozierend erkannten Nahrungsstoffe reproduzierbar auf ihre krankheitsbeeinflussende bzw. krankheitsauslösende Wirkung zu testen.

Alle bei einem Patienten als provozierend erkannten Nahrungsmittel wurden insgesamt dreimal für fünf Tage nach mehrwöchigen Auswaschphasen auf ihre verhaltensbeeinflussende Wirkung getestet.

B. 3. Studiendesign

Aus einem Pool von 70 Patienten mit hyperkinetischem Syndrom erfüllten 14 Patienten die in B. 1. beschriebenen Kriterien und wurden somit für unsere Studie ausgewählt. Für diese Patienten stand für das als provozierend identifizierte Nahrungsmittel ein nicht provozierendes Nahrungsmittel zur Verfügung, das hinsichtlich des Energiegehalts, der Verteilung von Protein, Kohlenhydrat, Fett, der Osmolarität und des Volumens vergleichbar war. Provozierende Nahrungsmittel, die diese Voraussetzung nicht erfüllten, wurden zu keinem Zeitpunkt des Experimentes eingesetzt.

Während des experimentellen Teiles wurden normale, standardisierte Mengen des provozierenden bzw. nicht provozierenden Nahrungsmittels verabreicht. Da eine Maskierung des provozierenden Nahrungsmittels nur für kleinste Nahrungsmengen möglich gewesen wäre, konnte ein Doppelblindversuch nicht durchgeführt werden.

Die Patienten wurden nun in zwei Gruppen aufgeteilt. Die Zuteilung zur jeweiligen Gruppe erfolgte durch Randomisierung (Abb. 4).

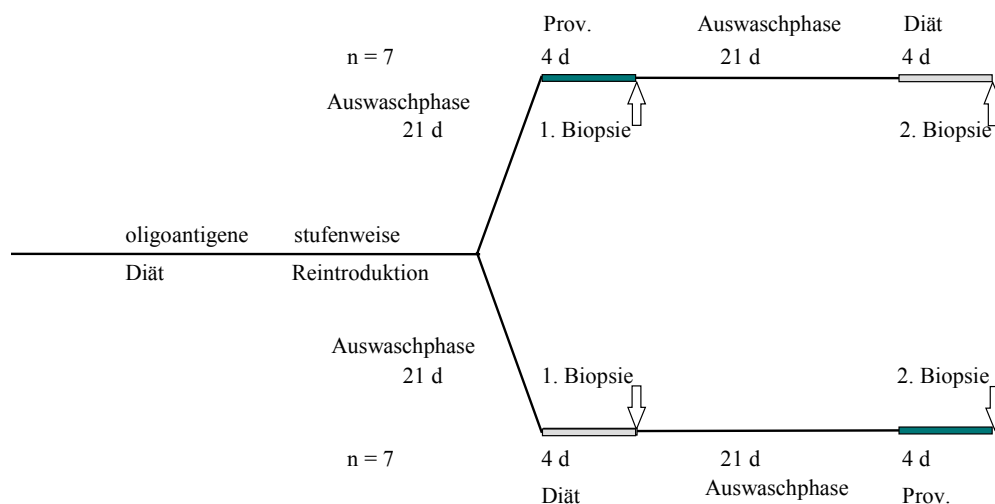


Abb. 4: Studiendesign

Wie aus Abb. 4 ersichtlich, schloß sich nach der Reintroduktionsphase für beide Gruppen eine 21-tägige sogenannte Auswaschphase an, in der alle für den jeweiligen Patienten als provozierend geltenden Nahrungsmittel streng vermieden wurden.

Nach diesen 21 Tagen ohne provozierende Nahrungsmittel wurden nun bei den Patienten der einen Gruppe (Abb. 4, oberer Arm) die jeweils für den einzelnen Patienten als provozierend getesteten Nahrungsmittel im Rahmen eines standardisierten Diätplanes verabreicht. Diese Provokationsphase wurde für vier Tage durchgeführt. Anschließend wurde die erste Dünndarmsaugbiopsie nach der in B. 2. 1. beschriebenen Methode durchgeführt.

Nach einer wiederum 21-tägigen Auswaschphase, in der die Patienten alles bis auf die provozierenden Nahrungsmittel essen durften, erfolgte nun die standardisierte viertägige Diätphase. In dieser wurden die in der Provokationsphase verabreichten provozierenden

Nahrungsmittel durch nicht provozierende Nahrungsmittel ersetzt. Die Nahrungszufuhr war im Rahmen des standardisierten Diätplanes hinsichtlich des Energiegehaltes, der Verteilung von Protein, Kohlenhydrat und Fett, der Osmolarität und des Volumens identisch. Im Anschluß erfolgte die zweite Dünndarmsaugbiopsie unter Diät.

Bei der anderen Patientengruppe der Randomisierung (*Abb. 4, unterer Arm*) wurde unter gleichen Bedingungen die erste Dünndarmsaugbiopsie unter Diät und die zweite Biopsie unter Provokation durchgeführt.

Es folgte dann die autoradiographische Untersuchung und anschließend die geblindete Auswertung der VIP-Rezeptorendichte der Enterozyten.

B. 4. Gewinnung des Untersuchungsmaterials

B. 4. 1. Dünndarmsaugbiopsie

Alle Dünndarmsaugbiopsien wurden im Dr. v. Haunerschen Kinderspital durch erfahrene Pädiater mit gastroenterologischer Ausbildung durchgeführt.

- Material

flexibler Schlauch aus Kunststoff, Metallkapsel, 20 ml Einwegspritze

- Methode

Die Patienten mit unter B. 2. beschriebenem Ernährungsschema blieben 6 Std. vor der Biopsie nüchtern und erhielten 15 Min. vor dem Eingriff 5 mg Diazepam intravenös.

Durch zeitgleiches Schlucken und Schieben wurde der Kunststoffschlauch mit der Biopsiekapsel in Richtung Duodenum vorgeschoben und unter Durchleuchtungskontrolle in der Flexura duodenojejunalis (Treitz'scher Winkel) positioniert.

Das durch Ziehen am Kolben der Einwegspritze erzeugte Vakuum öffnete die Verschlusskappe der Metallkapsel und durch den Unterdruck wurde ein Stück Dünndarmschleimhaut aspiriert.

Nach Ziehen des Schlauches wurde das Biopsat sofort aus der Metallkapsel entnommen und in drei Teile mit dem Skalpell geteilt. Das für die Studie zur Verfügung stehende Biopsatstück wurde sofort in ein Eppendorfgefäß gegeben und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Nach dem Schockgefrieren wurden die Biopsien bei -80°C im Gefrierschrank bis 1 d vor dem Rezeptorbindungsassay aufbewahrt.

Die Aufbewahrungszeit betrug längstens 20 Monate. Bei einer Aufbewahrungstemperatur von -80°C sind zeitbedingte Gewebeerkrankungen (Mantyh, 1988) in diesem Zeitraum sehr unwahrscheinlich.

B. 5. Rezeptorautoradiographie

B. 5. 1. Prinzip der Autoradiographie

Die meisten biologischen und pharmakologischen Vorgänge im menschlichen Organismus werden über die sogenannte Ligand-Rezeptorbindung vermittelt.

Ein bestimmtes Molekül bindet kompetitiv an einen Rezeptor der Zelloberfläche und durch die erfolgte Bindung des Liganden an seinen spezifischen Rezeptor wird über verschiedene Mechanismen eine biologische Wirkung erzielt.

Die Rezeptorautoradiographie ermöglicht es, diese Vorgänge in vitro nachzuvollziehen. Entwickelt wurde die Rezeptorautoradiographie von Young und Kuhar (1979). Grundlegende Methodenuntersuchungen wurden von Mantyh (1988) durchgeführt. Ausführliche autoradiographische Untersuchungen mit VIP erfolgten durch De Souza (1985) und Martin (1987). Zimmerman (1989) untersuchte erstmals VIP-Rezeptoren im humanen Gastrointestinaltrakt.

Ein radioaktiv markierter Ligand bindet an seinen spezifischen Rezeptor. Durch Fixierungsmethoden ist es möglich, diese Bindung irreversibel zu machen. Wird über dem zu untersuchenden Gewebe eine photosensitive Emulsion oder ein photosensitiver Film angebracht, wird dieser durch die radioaktive Strahlung des Liganden verändert. Aufgrund

dieses physikalischen Vorganges ist es möglich, Ligand-Rezeptorbindungen im Gewebe zu lokalisieren und zu quantifizieren.

Als Wert der quantitativen Bindung wird die spezifische Bindung angegeben. Wie in *Abb. 5* gezeigt, bindet der radioaktiv markierte Ligand an die spezifischen Rezeptoren der Zelle. Da der Ligand jedoch auch zu einem gewissen Anteil unspezifisch an das Gewebe bindet, muß diese unspezifische Bindung im Gewebe bestimmt werden. Die Ursachen der unspezifischen Bindung sind vielfältig (z. B.: elektrostatische Anziehungskräfte), es liegt jedoch auf keinen Fall der physiologische, biochemische Bindungsprozeß der spezifischen Bindung vor. Diese Tatsache ermöglicht es, die unspezifische Bindung zu messen:

Schnitte des zu untersuchenden Gewebes werden mit radioaktiv markiertem Ligand inkubiert. Die gebundene Aktivität entspricht zum einen der Rezeptorenmenge und zu einem geringen Anteil der „zufällig“ (unspezifisch) im Gewebe gebundenen Menge an radioaktiv markierten Liganden. Die gemessene Gesamtaktivität bezeichnet man als sogenannte „totale Bindung“, wobei der Anteil des unspezifisch gebundenen Liganden zunächst unbekannt bleibt. Dieser wird auf folgende Weise bestimmt:

Schnitte desselben Gewebes werden mit radioaktiv markierten Liganden inkubiert, wobei jetzt jedoch unmarkierter Ligand in tausendfach höherer Konzentration zugegeben wird. Gemäß dem Mechanismus der kompetitiven Verdrängung konkurrierender Moleküle wird der in Unterzahl vorhandene radioaktiv markierte Ligand von seinem Rezeptor verdrängt. Dieser Vorgang findet jedoch nicht beim unspezifisch im Gewebe gebundenen Liganden statt. Wird nun die Aktivität gemessen, wird nur noch unspezifisch im Gewebe gebundener Ligand erfaßt. Dieser Wert entspricht der sogenannten „unspezifischen Bindung“ (*Abb. 6*).

Die Differenz zwischen totaler Bindung und unspezifischer Bindung ergibt die „spezifische Bindung“, die die Grundlage aller Berechnungen dieser Arbeit ist.

Totale, unspezifische und spezifische Bindung können über mehrere Wege bestimmt werden. Einmal ist es möglich, mit Filterpapier die Gewebeschnitte nach der Inkubation vom Objektträger zu wischen und dessen Aktivität in einem Szintillationsmeßgerät zu messen. Diese Methode wurde in zahlreichen Voruntersuchungen dieser Studie angewandt. Eine weitere Möglichkeit der Quantifizierung ist die Emulsionsautoradiographie, die bereits eingangs erwähnt wurde. Die Messungen der Rezeptorendichte der Patienten in der Studie wurden mit der letztgenannten Methode bestimmt.

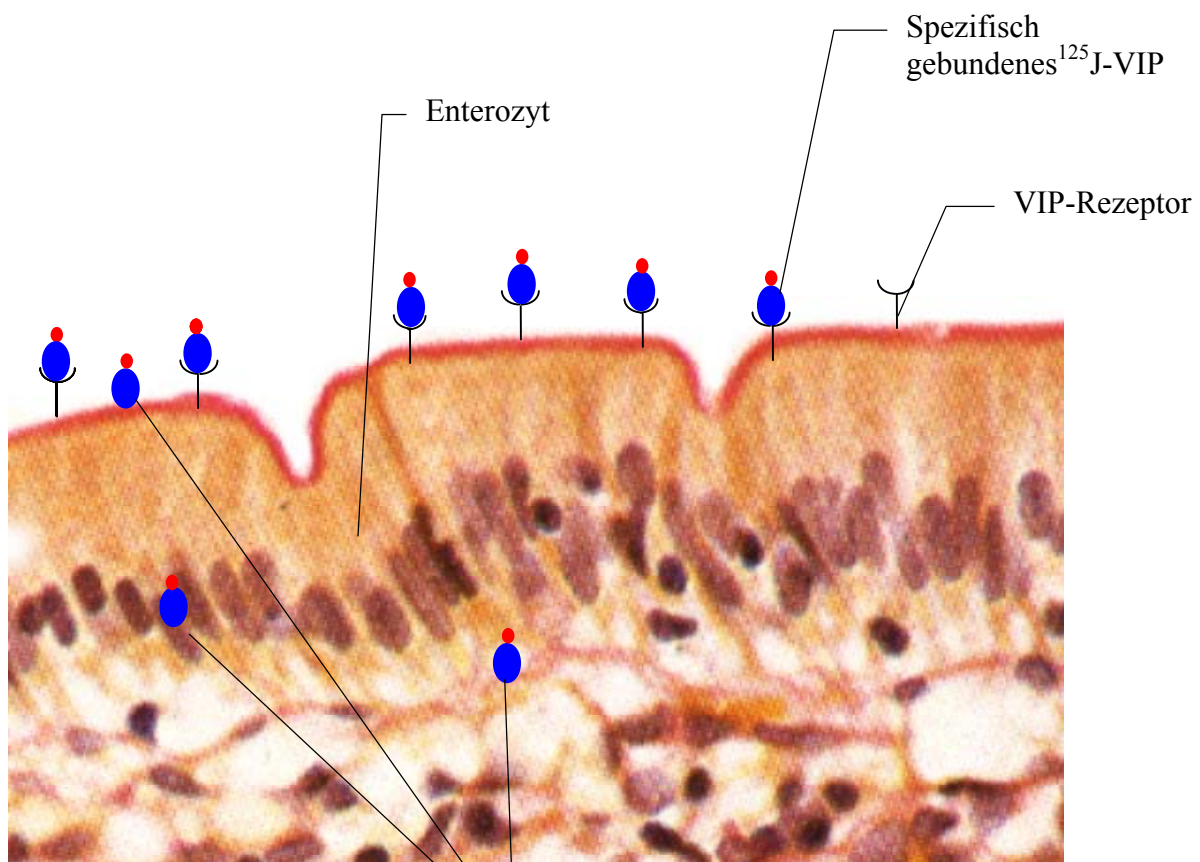


Abb. 5: Schematische Darstellung der Rezeptorautoradiographie (unspezifische Bindung)

Abb. 5 stellt die Bindung von ^{125}I -VIP an den VIP-Rezeptoren der Enterozyten schematisch dar. Wie bereits oben ausgeführt, bindet jedoch ein gewisser Teil des ^{125}I -VIP unspezifisch im Gewebe. Wird nun die Aktivität des gesamten ^{125}I -VIP gemessen, geht in diese Summe das spezifisch am Rezeptor gebundene und das unspezifisch im Gewebe gebundene VIP ein.

$$\begin{array}{r}
 \text{Unspezifisch gebundenes } ^{125}\text{I-VIP} \\
 + \\
 \text{Spezifisch gebundenes } ^{125}\text{I-VIP} \\
 \hline
 \text{Totale Bindung}
 \end{array}$$

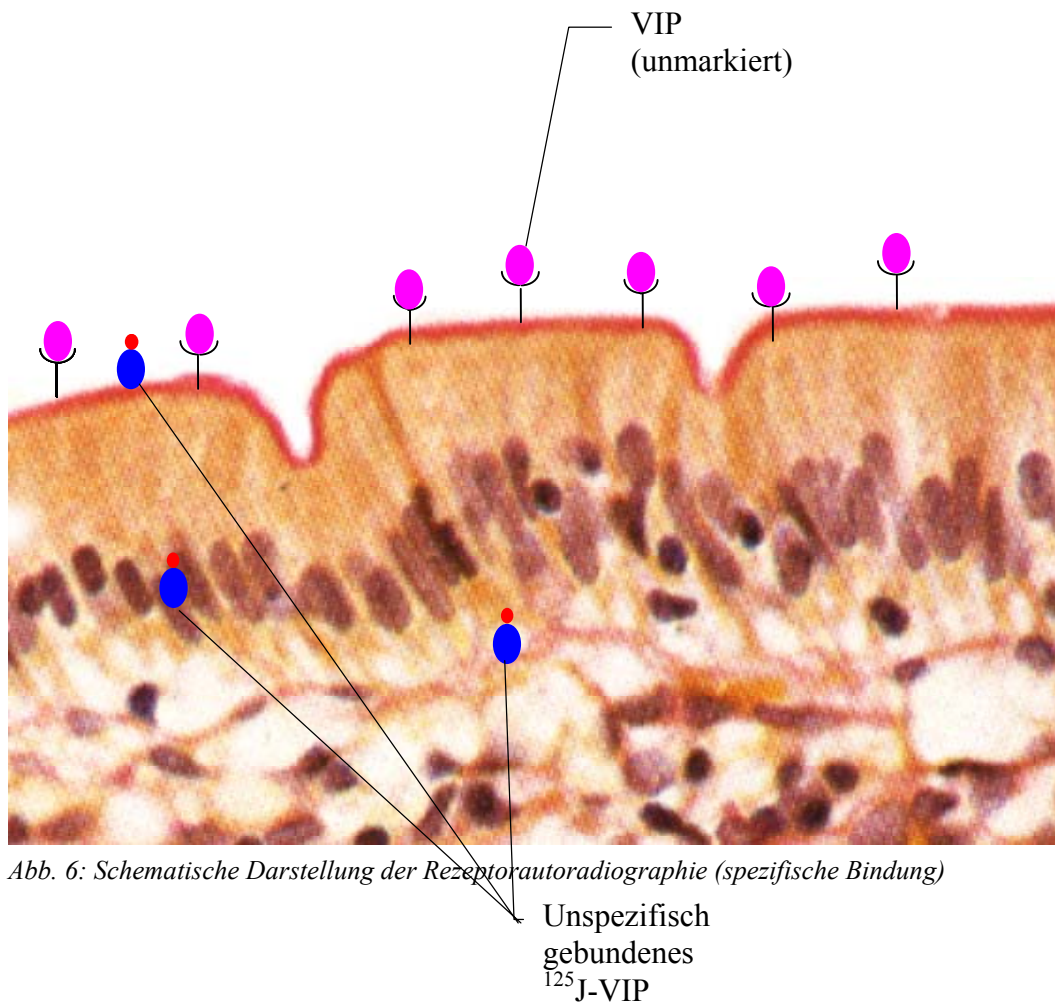


Abb. 6: Schematische Darstellung der Rezeptorautoradiographie (spezifische Bindung)

Abb. 6 soll die Messung der spezifischen Bindung illustrieren. Wie zuvor beschrieben, wird dazu unmarkiertes VIP in tausendfach höherer Konzentration als die ¹²⁵J-VIP-Konzentration zugegeben. Aufgrund der kompetitiven Verdrängung wird nun jedes ¹²⁵J-VIP aus der Rezeptorbindung verdrängt. An allen VIP-Rezeptoren findet sich jetzt unmarkiertes VIP. Unspezifisch im Gewebe gebundenes ¹²⁵J-VIP verbleibt jedoch in unveränderter Menge und stellt bei der Messung der Aktivität im Gewebe die unspezifische Bindung dar.

$$(\text{blue circle with red dot} + \text{blue circle with red dot}) - \text{blue circle with red dot} = \text{spezifische Bindung}$$

totale Bindung - unspezifische Bindung = **spezifische Bindung**

B. 5. 2. Materialien

- Untersuchungsmaterial

Dünndarmbiopsien der Patienten, die mittels der unter *B. 4. I.* beschriebenen Methode gewonnen wurden.

- Verbrauchsmaterial

- Glasobjektträger mit einseitigem Mattschliff
- Deckgläser (22x74 mm)
- Metallobjektträgergestelle
- Färbetröge mit Taucheinsatz aus Kunststoff (Vitlab, D-Seeheim)
- Transportgefäße (Herenz, D-Hamburg)
- Falcon Blue Max-Röhrchen (Vertrieb Boll, D-München)
- qualitatives Filterpapier ø 7.0 cm (Whatman International Ltd., GB-Maidstone)
- Zählfläschchen (Vials) für die Flüssigkeitsszintillationsmessung (20 ml)
- LM 1-Photoemulsion für die Lichtmikroskopie (Amersham- Buchler, D-Braunschweig)
- Kodak-D19-Entwickler (Kodak, D-München)
- Kodak-Unifix (Kodak, D-München)

- Geräte

- Standard-Exsikkatoren (Vertrieb Boll, D-München)
- Trockenschrank (Memmert, D-Schwabach)
- Kryostat (Cryocut E, Reichert-Jung über Leica, D-Bensheim)
- Ultraschall Sonifier B-10-L (Branson Sonic Power Co., USA-Danbury, CT)
- γ -Counter (Berthold 12-Kanal-Multigammazähler LB 211, D-Wildbad)

- Reagenzien

- [3-Iodotyrosyl-I125] Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP), Ausgangsaktivität: 500 KBQ (Amersham Buchler, D-Braunschweig)
- Vasoactive Intestinal Peptide human/porcine/rat 28 amino acids (Bissendorf-Saxon Biochemicals, D-Hannover)

Die sonstigen verwendeten Reagenzien stammten in analysenreiner Form oder in der reinst erhältlichen Form von den Firmen Sigma (D-Deisenhofen), Boehringer (D-Mannheim), Merck (D-Darmstadt), Bio-Rad (D-München).

- Lösungen

Die benötigten Lösungen werden in den Beschreibungen des jeweiligen Experiments aufgeführt.

B. 5. 3. Versuchsvorbereitung

B. 5. 3. 1. Vorbehandlung der Objektträger

- Reinigen

Die in Kunststoffobjektträgergestellen eingeordneten Objektträger wurden zuerst für 5 Min. in Aceton getaucht. Nach kurzem Abdampfen wurden sie für 5 Min. in Methanol getaucht. Anschließend wurden sie in drei nacheinanderfolgenden Gefäßen mit Aqua bidest. für je 5 Min. gewaschen. Im Trockenschrank erfolgte bei 40°C das Trocknen für 4 Std..

- Gelatinieren

1,0 g Gelatine wurde in 200 ml Aqua bidest. durch Erwärmen auf 55°C gelöst. Nach Abkühlen in Eis wurde die Lösung zweimal filtriert. Die Objektträger in den Gestellen wurden viermal kurz in absolutem Ethanol, anschließend einmal kurz in Aqua bidest. eingetaucht. Nun wurden sie für 5 Sek. langsam in die Gelatinelösung getaucht und ebenso gleichmäßig aus der Lösung wieder entfernt. Durch vertikales Aufstellen (Mattrand der Objektträger nach unten) ließ man über 15 Min. überflüssige Gelatine ablaufen. Darauf schloß sich das Trocknen im Ofen bei 37°C über 4 Std. an.

In den schwarzen Plastikboxen wurden die gelatinisierten Objektträger staubfrei bis zur Verwendung aufbewahrt.

30 Min. vor Gebrauch wurden die Objektträger auf die verwendete Schneidetemperatur äquilibriert (Kuhar, 1985).

B. 5. 3. 2. Vorbereiten und Schneiden der Dünndarmbiopsien

Die Dünndarmbiopsien wurden nach dem Schockgefrieren in schwarzen Plastikboxen, deren Boden mit Kieselgel bedeckt war, bei -80°C aufbewahrt.

Vor dem Schneiden wurde die jeweilige Biopsie bei -20°C für 30 Min. im Kryostat temperaturäquilibriert. Nach Fixieren der Biopsie am Schneidetisch wurde eine Schnittdicke von 20 µm bei einer Schneidetemperatur von -20°C gewählt. Bei diesen Parametern erzielt man sowohl eine optimale Auflösung des Gewebes als auch eine gute, gleichmäßige Schnittqualität (Mantyh 1988).

Nach dem Aufbringen von vier Schnitten auf den Objektträger (*Abb. 7*) strich man langsam mit dem Finger über die Unterseite des Objektträgers, so daß die Schnitte anschmolzen (sogenannte „thaw-mount procedure“) (Stumpf, 1966).

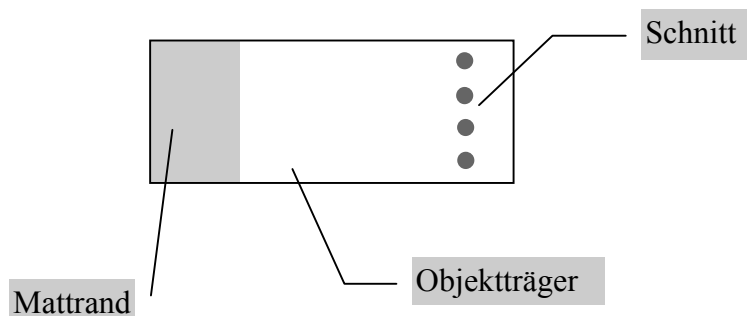


Abb. 7: Aufsicht eines Objektträgers mit vier Schnitten

Bis zur Vollendung aller Schnitte wurden die Objektträger mit den Schnitten im Objektträgergestell in einer Plastikbox, die Kieselgel enthielt, auf Eis gelagert. Die Objektträger mit den Schnitten wurden bis zur Inkubation unter Vakuum bei 4°C für 10 Std. getrocknet.

B. 5. 3. 3. Vorbereiten der Reaktionsgefäße

Alle zur Aufbewahrung von Stammlösungen und für Inkubationen eingesetzten Gefäße wurden vorbehandelt, um die Adsorption von Peptiden und Proteinen an die Gefäßwände so gering wie möglich zu halten. Die als Inkubationsgefäße benutzten Transportbehälter wurden für 1 Min. mit Sigmacote® gefüllt und anschließend mit der Öffnung nach unten im Abzug getrocknet. Ebenso wurde mit den Eppendorfgefäßen verfahren, in denen die Stammlösungen von Peptiden bei -20°C aufbewahrt wurden.

Serielle Verdünnungen von Peptiden wurden in Eppendorfgefäßen angesetzt, der Inkubationspuffer in silikonisierten Falcon Blue Max-Gefäßen aufbewahrt. Diese wurden bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

B. 5. 4. Versuchsdurchführung

B. 5. 4. 1. Bindungsreaktion

Um eine optimale Bindung des jodierten VIP zu erreichen, sind mehrere Schritte vor der eigentlichen Inkubation mit ^{125}J -VIP notwendig. Nach den in B. 5. 3. beschriebenen Vorarbeiten wurden die Objektträger aus dem Vakuumexsikkator entfernt. Die Schnitte erschienen nun glasig transparent auf den Objektträgern.

Alle nun folgenden Schritte fanden, wenn nicht anders erwähnt bei konstant 4°C im Eisbad statt.

Für Präinkubation, Vorwaschen und Waschen wurden Glasfärbegestelle (Inhalt: 50 ml des jeweiligen Reagenz) verwendet, in denen je Gefäß vier Objektträger Platz fanden. Die Inkubation fand in silikonisierten Transportgefäßen für vier Objektträger statt (Abb. 8).

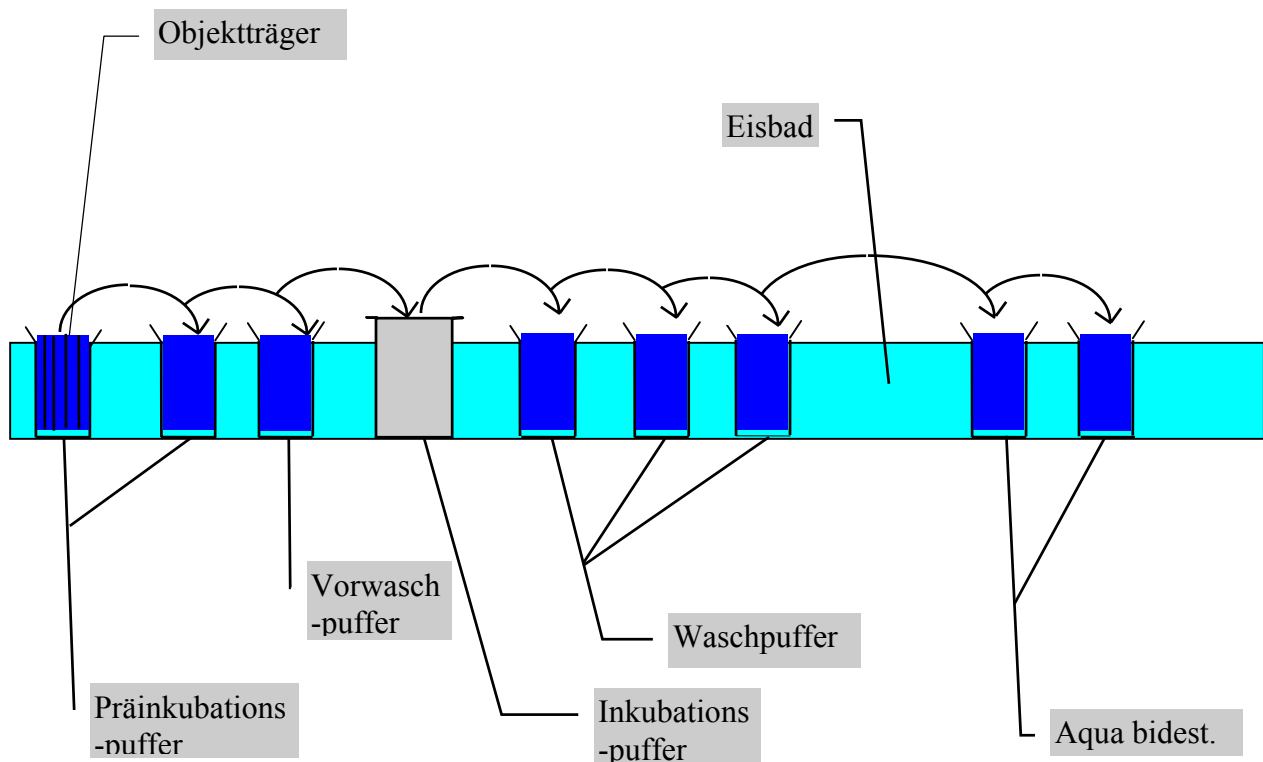


Abb.8: Ansicht der Versuchsanordnung von vorne

Zuerst wurden die Schnitte für 15 Min. vorinkubiert. Die Vorinkubation diente der Entfernung natürlicher VIP-Liganden und der Äquilibration der Schnitte im Puffermilieu.

Zusammensetzung des Präinkubationspuffers:

	<i>pH: 7.40</i>
- <i>Tris/HCl</i>	<i>50 mM</i>
- <i>BSA proteasefrei (Fraction V)</i>	<i>1%</i>
- <i>KCl</i>	<i>10 mM</i>
- <i>Polyethylenamin</i> (<i>Polyethylenamin erst kurz vor Versuch begeben</i>)	<i>0.002%</i>

Anschließend wurden die nun vorinkubierten Schnitte für zweimal 5 Min. in Gefäße mit Vorwaschpuffer überführt. In diesem Schritt wurden überschüssige Elektrolyte und überschüssiges Polyethylenamin entfernt.

Zusammensetzung des Vorwaschpuffers:

	<i>pH: 7.40</i>
- <i>Tris/HCl</i>	<i>50 mM</i>
- <i>BSA proteasefrei (Fraction V)</i>	<i>1%</i>

Zur Inkubation mit ¹²⁵J-VIP bzw. VIP wurden die Objektträger in die Transportgefäße gegeben. Diese enthielten je 3 ml Inkubationspuffer mit markierten VIP bzw. zusätzlich nicht markiertes VIP in 3000-fachem Überschuß zur Bestimmung der unspezifischen Bindung. Die Inkubationsdauer betrug 180 Min. bei 4°C.

Zusammensetzung des Inkubationspuffers:

	<i>pH: 7.40</i>
- <i>Tris/HCl</i>	<i>50 mM</i>
- <i>MgCl₂</i>	<i>3 mM</i>
- <i>Aprotinin</i>	<i>5000 KIU/100 ml</i>
- <i>Bacitracin</i>	<i>4 mg/100 ml</i>

- Chymostatin	0.5 mg/100 ml
- Leupeptin	0.4 mg/100 ml
- BSA proteasefrei (Fraction V)	1%
- MnCl ₂ (zuletzt begeben!)	3 mM
- [¹²⁵ J] VIP Amersham	150000 cpm/ml
- VIP Bissendorf	1 µM

Um die Bindungsreaktion zu beenden und überschüssige Liganden zu entfernen, wurden die Objektträger nach 180 Min. Inkubation sofort je dreimal für 5 Min. in Waschpuffer überführt.

Zusammensetzung des Waschpuffers:

	pH: 7.40
- Tris/HCl	50 mM
- MgCl ₂	3 mM

Nach diesem Waschvorgang wurden die Objektträger nochmals in zwei hintereinanderfolgenden Gefäßen mit Aqua bidest. für jeweils 1 Sek. 5x eingetaucht, um Puffersalze von den Schnitten zu entfernen.

B. 5. 4. 2. Trocknen

Nach dem Eintauchen in eiskaltem Aqua bidest. ist es notwendig, sofort die auf den Schnitten verbliebene Flüssigkeit zu entfernen. Dies geschah mit einem Kaltluftfön, der im Abstand von 50 cm im schrägen Winkel auf die Schnitte gerichtet wurde. Kanten und Unterseite der Objektträger wurden mit Filterpapier getrocknet.

Die Objektträger wurden nun für 10 Std. im Exsikkator bei 4°C aufbewahrt.

B. 5. 4. 3. Vorfixieren

Um eine optimale Bewahrung der Gewebestruktur zu erreichen und die Ligandenbindung an die Rezeptoren irreversibel zu machen, müssen die Objektträger nach dem Trocknen fixiert werden. Die verwendete Substanz darf jedoch keinen Einfluß auf die folgenden photochemischen Prozeduren haben. Diese Forderungen erfüllt eine Fixierung mit Paraformaldehyd (Hendrickson, 1972).

25g Paraformaldehyd wurden auf einer Glasschale bei Raumtemperatur und einer Luftfeuchtigkeit von 30-60% im Abzug für 48 Std. äquilibriert. Die Glasschale mit Paraformaldehyd wurde anschließend auf den Boden des Exsikkators gestellt und nach

Zugabe der Objektträger wurde ein Vakuum angelegt. Für den eigentlichen Fixierungsvorgang wurde der Exsikkator mit den Objektträgern für 120 Min. auf 80°C im Ofen erhitzt.

Sofort nach dem Öffnen des Exsikkators wurden die Objektträger entnommen und für 10 Std. im Abzug belassen. Um mögliche Artefakte auf die Photoemulsion durch Paraformaldehyd zu vermeiden, ist es notwendig diese sogenannte Abdampfzeit einzuhalten und die Schnitte zu entfetten (Herkenham, 1988).

B. 5. 4. 4. Entfetten

Die Schnitte wurden zunächst in aufsteigenden Konzentrationen von Methylalkohol (70%, 80%, 95%, 100%) für jeweils 2 x 5 Min. entfettet und dann für 60 Min. in 100% Xylol getaucht.

Anschließend wurden die Schnitte in absteigenden Konzentrationen von Methylalkohol (100%, 95%, 80%, 70%) sowie in Aqua bidest. für je 2 x 5 Min. rehydriert und nachfolgend im Ofen bei 40°C über Nacht getrocknet.

Die so behandelten Schnitte konnten nun der Exposition zugeführt werden.

B. 5. 5. Mikroautoradiographie

Wie bereits im *Kapitel B. 5. 1.* erwähnt, kann die im Gewebe gebundene Radioaktivität mittels Photoemulsion sichtbar gemacht werden. Dadurch wird eine Quantifizierung der Rezeptor-Ligandenbindung möglich.

Mit [3H]-sensitiven Filmen, die auf die Gewebeschnitte gelegt werden, können Ligand-Rezeptorenbindungen lokalisiert werden. Für eine genaue Quantifizierung ist diese Methode jedoch nicht optimal. Aus diesem Grunde wurde in dieser Studie von der Emulsionsautoradiographie Gebrauch gemacht.

B. 5. 5. 1. Emulsionsautoradiographie mittels Coverslip-Methode

Bei der Emulsionsautoradiographie wird ein mit photosensitiver Schicht überzogenes, sehr dünnes Glasplättchen (Coverslip) in Größe des Objektträgers auf den Objektträger mit den Gewebeschnitten dicht aufgelegt und über einen bestimmten Zeitraum in absoluter Dunkelheit exponiert. Anschließend wird die Photoschicht entwickelt und fixiert. Eine bestimmte Menge an gebundenem ¹²⁵J-VIP entspricht einer bestimmten Menge an Silberkörnchen (grains) auf der Photoemulsion abzüglich der unspezifischen Bindung.

Alle Vorgänge der Emulsionsautoradiographie fanden bei absoluter Dunkelheit in der Dunkelkammer statt.

Nachdem die Photoemulsion in einem thermostatisierten Wasserbad bei 43°C vollständig geschmolzen war, wurde sie in ein Dippinggefäß umgefüllt, bis dieses etwa zur Hälfte gefüllt war. Durch langsames Umrühren entfernte man evtl. vorhandene Luftblasen solange, bis sie auf Test-Coverslips nicht mehr nachweisbar waren.

Nun wurden die Coverslips mit der Photoemulsion überzogen. Dazu tauchte man sie für 5 Sek. in das Dippinggefäß, so daß 50% bis 75% der Fläche mit Photoemulsion bedeckt war und zog sie langsam (2 Sek.) heraus. Die überflüssige Emulsion wurde an der Kante des Dippinggefäßes abgestreift und das Coverslip auf Filterpapier für 2 x 5 Sek. gestellt.

Die so überzogenen Coverslips wurden in Objektträgerhalter eingeordnet und in einer lichtdichten Box aus Aluminium, die Kieselgel enthielt, für 8 Std. getrocknet.

Die mit Photoemulsion überzogenen, nun getrockneten Coverslips wurden auf die zu untersuchenden Objektträger fixiert, indem das emulsionsfreie Ende des Coverslips mit UHU®-Pen-Sekundenkleber auf das mattierte Ende des Objektträgers geklebt wurde, so daß die Emulsion direkt auf den radioaktiv inkubierten Gewebeschnitten zu liegen kam (Abb. 9).

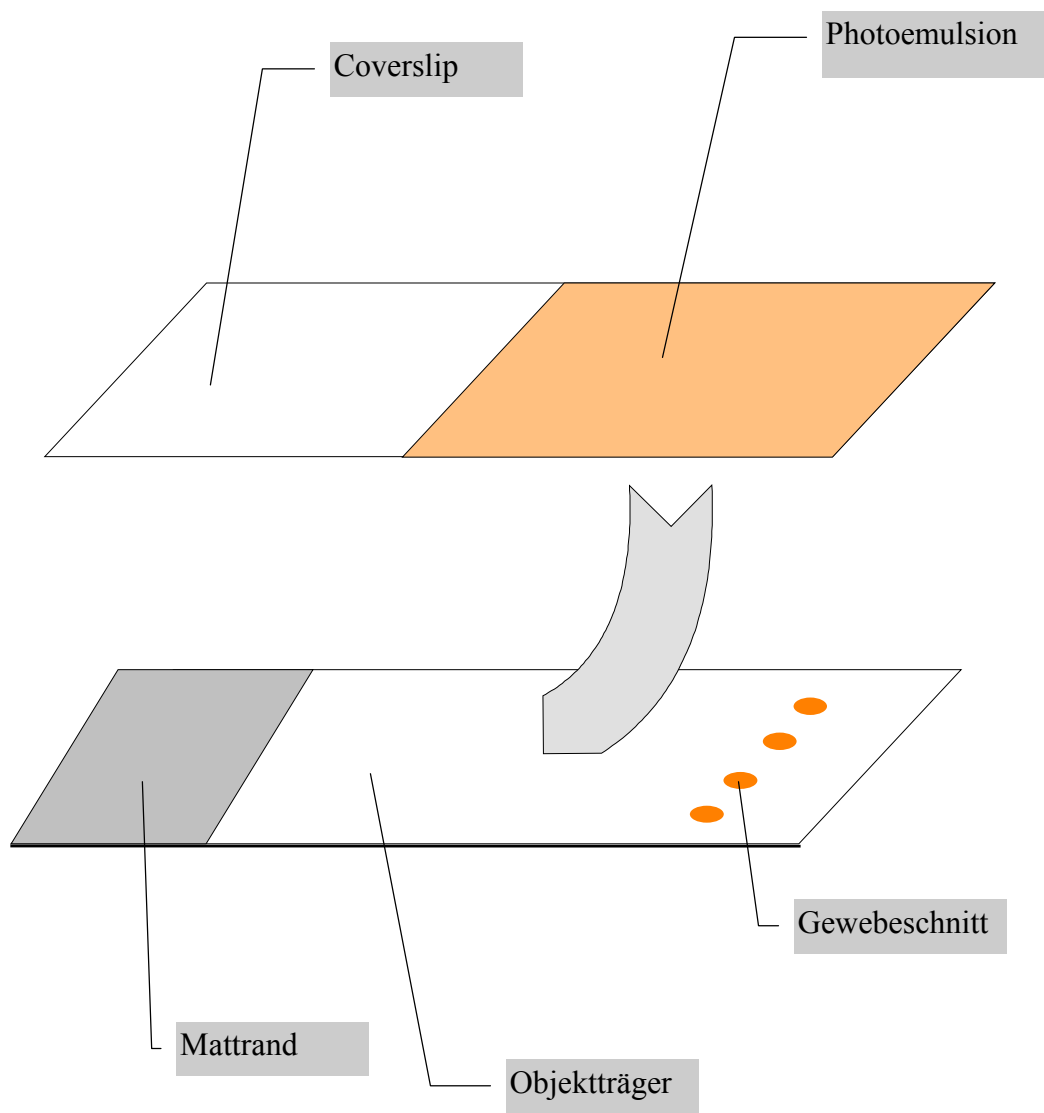


Abb. 9: Schematische Darstellung der Coverslip-Methode

Zur sicheren und maximalen Gewebenähe wurde das Coverslip an beiden Enden mit Klammern an den Objektträger fixiert. Die so fixierten Objektträger wurden in lichtundurchlässige mit Kieselgel gefüllte Boxen gelegt und bei 4°C für 48 Std. exponiert.

B. 5. 5. 2. Entwickeln der Photoemulsion

Alle Vorgänge der Entwicklung fanden erneut ohne Rotlicht in der Dunkelkammer statt. Die fixierten Objektträger wurden aus den schwarzen Boxen entnommen und die dem Mattrand gegenüberliegende Klemme entfernt. Die Klemme auf dem geklebten, emulsionsfreien mattierten Ende wurde belassen. Die dem Mattrand gegenüberliegende Seite des Coverslips wurde nun vorsichtig angehoben und ein kleines Holzstäbchen zwischen Objektträger und dem angehobenen Coverslip eingespreizt. Die so gespreizten Objektträger-Coverslip-Gebilde wurden in Objektträger-Halter eingeordnet, um die Entwicklung durchzuführen.

Hierzu wurden die Objektträgerhalter 2 Min. in Kodak® D19-Entwickler gestellt und alle 30 Sek. 3x leicht bewegt. Anschließend wurde die Entwicklung im Stopppad (Aqua bidest und 0,5% Essigsäure) beendet (10 Sek.). Die Fixierung wurde für 5 Min. in Kodak®-Unifix durchgeführt, wobei nach den ersten zwei Minuten die Halter wiederum leicht bewegt wurden. Es folgte das Waschen für 2 x 5 Min. in Aqua bidest, nach jeder Minute wurden die Halter leicht bewegt. Nach Abrinnen des Wassers wurden die beladenen Halter bis zum Färbevorgang in einer staubfreien Box getrocknet und gelagert.

B. 5. 5. 3. Kontrolle der Photoemulsion

Um Artefakte der Emulsion und Fehler bei der Durchführung der Entwicklung zu erkennen, wurden bei jedem Versuch zusätzliche Objektträger als Kontrolle mitgeführt.

Zur Kontrolle der Emulsion wurden auf zwei gelatinierte Objektträger, auf denen sich keine Gewebeschnitte befanden, ebenfalls photoemulsionbeschichtete Coverslips geklebt und entwickelt. Die Emulsion durfte nach Ende der Entwicklung keine Schwärzung zeigen.

Zur Kontrolle auf positive Chemographie wurden zwei Objektträger, auf denen sich unmarkierte Gewebeschnitte befanden, wie die Versuchsobjektträger behandelt. Nach Entwicklung durfte ebenfalls keine Schwärzung erkennbar sein, da das Gewebe nicht radioaktiv markiert war.

Zur Kontrolle auf negative Chemographie wurden zwei mit beschichteten Coverslips beladene Objektträger mit markierten Schnitten kurz lichtexponiert und dann normal weiterverarbeitet. Hier mußte eine vollkommene Schwärzung der Emulsion auftreten.

B. 5. 6. Histologische Färbung der Gewebeschnitte

Um die histologischen Strukturen der Gewebeschnitte darzustellen, wurde eine Hämatoxilin-Eosin-Färbung (Mayer-Färbung) durchgeführt.

Hierzu wurden die Objektträger mit den abgespreizten Coverslips im Objektträgerhalter zuerst 1 Min. in Aqua bidest. gewässert. Danach wurden die Objektträger 2 Min. in Hämatoxilin gefärbt, für 10 Sek. in Aqua bidest. gestellt und bei fließendem Wasser für 7

Min. gewaschen. Es folgte die Färbung in Eosin für 50 Sek., sowie das Waschen in Aqua bidest für 1 Min. und in fließendem Wasser für 30 Sek..

Die Dehydrierung erfolgte in Ethanol-Lösungen mit zunehmender Konzentration, wobei die Halter für 1 Min. in 70%, 2 Min. in 80%, 2 x 2 Min. in 95% und 2 Min. in 100% Ethanol belassen wurden. Abschließend folgte das Waschen in 100% Xylol für 4 Min..

Sofort nach dem Entfernen der Objektträger aus dem Xylol wurde 1 Tropfen Eukit auf den Objektträger getropft, das Holzstückchen herausgezogen und das Coverslip auf den Objektträger geklebt. Nachdem die geklebten Objektträger 1 Std. flach liegend getrocknet waren, wurden sie in histologischen Schachteln aufbewahrt und konnten nun ausgewertet werden.

B. 5. 7. Computerunterstützte quantitative Bestimmung der Rezeptorendichte

(durchgeführt mit Unterstützung des Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit, GSF, in München-Neuherberg)

Wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben, repräsentiert eine bestimmte Menge an Silberkörnchen (grains) auf den Gewebeschnitten eine bestimmte Anzahl von Rezeptoren im zu untersuchenden Gewebe. Ziel der nun folgenden Auswertung war es, die Menge der Silberkörnchen in der Dünndarmmukosa der Patienten zu bestimmen.

- Material

- Objektträger mit den Gewebeschnitten, die wie in *Kapitel B. 5.* vorbehandelt waren.

- Geräte

- Bild-Analyse-System (SAMBA, Alcatel-Titn Answare, Grenoble, France) (Brugal, 1987)
- Mikroskop, Objektiv 25x, numerische Apertur 0,55, Optovar 1.6, Filter 0G45 (Zeiss UEM, Oberkochen, FRG)
- CCD-TV Kamera (Hamatsu, C3077, Tokyo, Japan)
- MS-DOS-Computer
- Bildverarbeitungsprogramm „ARA“ (GSF, Neuherberg, BRD)

- Durchführung

Die Untersuchung der Gewebeschnitte erfolgte geblindet. Die Gewebeschnitte wurden zunächst auf ihre Schnitt-, Färbe- und Bindungsqualität hin geprüft. Mit der oben erwähnten Bildverarbeitungseinheit ist es möglich einzelne Bezirke des Gewebeschnittes (z.B. Dünndarmmukosa) am Computerbildschirm zu kennzeichnen und die Fläche des markierten Bereichs zu vermessen (Brugal, 1987).

Der auszuwertende, markierte Gewebebereich wurde nun in 512 x 512 Pixel, wobei der Pixelabstand 0,273 µm betrug, digitalisiert. Anschließend wurde die Anzahl und die Fläche der in dem markierten Gewebeschnitt enthaltenden Silberkörnchen gemessen.

Die Anwendung eines Digital-Bild-Filters mit angepaßter Filtermatrix (Dark Tophat Transformation) stellte sicher, daß nur Silberkörnchen in der Messung erfasst wurden.

Wie bereits zuvor ausführlich beschrieben, beruht das Prinzip der Autoradiographie auf den Messungen der totalen und der unspezifischen Bindung, um die spezifische Bindung errechnen zu können. Für jeden markierten Bereich eines Gewebeschnittes wurde die totale und die unspezifische Silberkörnchendichte gemessen. Die für jede Biopsie gemessene

Silberkörnchenfläche der unspezifischen Bindung wurde von der Fläche der Silberkörnchen der totalen Bindung subtrahiert. Somit erhielt man den Flächenwert der spezifischen Bindung. Dieser Flächenwert wurde nun prozentual zur Gesamtfläche des markierten Gewebeschnitts in Bezug gesetzt.

Fläche der Gewebemarkierung (μm^2) / Fläche der Silberkörnchen (μm^2) = Anteil der Silberkörnchen an der Gesamtfläche (%)

B. 5. 8. Statistische Auswertung der quantitativen Bestimmung der Rezeptorendichte

Von jedem Patienten existierte eine Biopsie unter Diät und unter Provokation. Jede Patientenbiopsie wurde in zwei unabhängigen autoradiographischen Versuchsdurchläufen untersucht.

Pro Versuchsdurchlauf wurden von jeder Patientenbiopsie 16 Gewebeschnitte angefertigt (8 Gewebeschnitte für die totale Bindung und 8 Gewebeschnitte für die unspezifische Bindung). Wie bereits erwähnt, erfolgte die computerunterstützte quantitative Bestimmung der Rezeptorendichte geblindet.

Pro Gewebeschnitt wurden mindestens 200 Enterozyten vermessen und die Silberkörnchenfläche bestimmt. Die spezifische Bindung spiegelt somit die Rezeptorendichte von mindestens 1600 Enterozyten pro Versuchsdurchlauf wider. Da zwei Versuchsdurchläufe stattfanden, wurde die mittlere Rezeptorendichte eines Patienten unter Diät bzw. unter Provokation aus mindestens 3200 Enterozyten bestimmt.

Somit stand die prozentuale Silberkörnchendichte aus mindestens 3200 Enterozyten unter Diät, der prozentualen Silberkörnchendichte aus mindestens 3200 Enterozyten unter Provokation zum Vergleich gegenüber.

Diese Werte wurden mit Hilfe des T-Testes verglichen. Signifikanz wurde bei einem $p < 0,05$ angenommen.

Der bei einer Crossover-Studie notwendige Ausschluß eines Überhangeffektes erfolgte durch die Varianzanalyse für Crossover-Design.

B. 5. 9. Qualitätssicherung und Optimierung der autoradiographischen Methode

B. 5. 9. 1. Nachweis der biochemischen Intaktheit von VIP und ^{125}J -VIP durch High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)

Vor jedem Versuchsdurchgang mußte sichergestellt werden, daß die verwendeten VIP-Peptide (VIP und ^{125}J -VIP) biochemisch in einwandfreiem Zustand vorlagen. Hierfür wurde die High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) eingesetzt.

- Material:

- [3-Iodotyrosyl-I125] Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP), Ausgangsaktivität: 500 KBQ (Amersham Buchler, D-Braunschweig)
- Vasoactive Intestinal Peptide human/porcine/rat 28 amino acids (Bissendorf-Saxon Biochemicals, D-Hannover)

- Reagenzien

Inkubationspuffer	(s. B. 3. 4. 1. Bindungsreaktion)		
Puffer A: Zusammensetzung (Anteile):	Acetonitril 10	Wasser bidest. 90	Trifluoressigsäure 0.1
Puffer B: Zusammensetzung (Anteile):	Acetonitril 10	Wasser bidest. 90	Trifluoressigsäure 0.1
Puffer C: Zusammensetzung (Anteile):	Acetonitril 100	Wasser bidest. 0	Trifluoressigsäure 0.1

- Geräte

- Niederdruck-Pumpe 655 A-12 (Merck-Hitachi, D-Darmstadt)
- C18 Reverse-Phase-Säule (Merck LiChroCART 250-4, Supershep 100, RP 18 encapped, Merck-Hitachi, D-Darmstadt)
- Wärmebad
- variable UV-Detektoren (655A, Wellenlänge 210nm, Merck-Hitachi, D-Darmstadt)
- Fraktionskollektor (Advantec SF 2120 Super Fraction Collector Merck-Hitachi, D-Darmstadt)
- Chromatographensystem Gynkosoftware (Gynkotec, D-Germering)
- γ -Counter (Berthold 12-Kanal-Multigammazähler LB 211, D-Wildbad)

- Durchführung

65.4 μg VIP wurden zu 200 μl Inkubationspuffer gegeben, in einer Hamilton-Spritze aufgezogen und 50 μl der vorbereiteten Probe in die Niederdruck-Pumpe injiziert. Diese Pumpe transportierte die Analyse durch eine C18 Reverse-Phase-Säule. Für den

Probendurchlauf in der Säule wurde ein Gradientensystem mit drei verschiedenen Fließpuffern verwendet.

Als Transportmedium wurden oben beschriebene Puffer benutzt. Es erfolgte ein linearer Gradientenübergang von Puffer A zu Puffer B innerhalb von 60 Min.. Anschließend wurde auf Puffer C als Reinigungsgradienten innerhalb von 15 Min. umgestellt. Es schloß sich eine Reäquilibration über 10 Min. auf Puffer A an, gefolgt von einer Äquilibration mit Puffer A für 20 Min.. Die Flußrate betrug konstant 1 ml/Min.. Um eine größtmögliche Konstanz der Retentionszeiten zu erreichen, wurde die Säule in einem Wasserbad auf 25°C temperiert. Das Signal des UV-Detektors wurde mit dem Gynkosoftware-Chromatographensystem ausgewertet. Die Peptide wurden durch UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 210 nm detektiert.

Der Nachweis biochemischer Intaktheit von [125 J] markiertem Vasoactive Intestinal Peptide wurde ebenfalls mit der High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) erbracht. 500000 cpm 125 J-VIP und 5 nmol unmarkiertes VIP wurden zu 100 µl Inkubationspuffer zugegeben. Unmarkiertes VIP wurde zur Sättigung eventuell in der Säule vorhandener VIP-Bindungsstellen beigegeben. Mit einer 100 µl Hamilton Spritze wurden 50 µl der vorbereiteten Probe in die Niederdruck-Pumpe injiziert. Der Säulendurchlauf entsprach der bei VIP beschriebenen Methode. Das Flußmedium wurde nach Durchlaufen des variablen UV-Detektors im Minutenabstand durch einen Fraktionskollektor auf 90 Sammelgefäße verteilt. Die im Minutenabstand gewonnenen Fraktionen wurden anschließend in einem γ -Counter vermessen.

B. 5. 9. 2. Nachweis der biochemischen Intaktheit von 125 J-VIP nach 180 Minuten Inkubationszeit durch High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)

Um sicherzustellen, daß während der 180 minütigen Inkubation der Gewebeschnitte keine signifikante Degradation von 125 J-VIP stattgefunden hat, wurde 125 J-VIP 200 Min. nach Beginn der Inkubation mit HPLC nochmals auf Degradationsprodukte hin untersucht. Es wurden 50 µl aus dem Inkubationspuffer analysiert, die Versuchsdurchführung fand wie im *Kapitel*

B. 5. 9. 1. beschrieben durch High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) statt.

B. 5. 9. 3. Optimierung der Versuchsbedingungen

B. 5. 9. 3. 1. Bestimmung der optimalen Polyethylenaminkonzentration im Präinkubationspuffer

Zu Beginn unserer Versuche erwies sich eine sehr hohe Bindung des radioaktiven Liganden an das Glas des Objektträgers als Problem. Trotz Veränderungen der Inkubationszeit, der Versuchstemperatur und der Zusammensetzung der Puffer ließ sich die hohe Glasbindung von $^{125}\text{J-VIP}$ nicht reduzieren. Eine mögliche Ursache sahen wir in der negativen elektrischen Ladung des Glases und der bei einem pH von 7.4 positiven elektrischen Ladung von $^{125}\text{J-VIP}$. Um die negative elektrische Ladung des Objektträgers zu vermindern, wurde dem Inkubationspuffer Polyethylenamin zugegeben (Mantyh, 1988). Dadurch konnte die $^{125}\text{J-VIP}$ Glasbindung nahezu eliminiert werden. Um Artefakte der $^{125}\text{J-VIP}$ -Bindung am Gewebe sicher auszuschließen, war es notwendig die Polyethylenaminkonzentration zu wählen, mit der die $^{125}\text{J-VIP}$ -Glasbindung maximal vermindert wurde ohne Einfluß auf die Ligandenbindung im Gewebe zu haben.

Hierzu wurden mehrere Versuchsreihen mit verschiedenen Polyethylenaminkonzentrationen im Präinkubationspuffer durchgeführt. Unter identischen Versuchsbedingungen wie unter B. 5. beschrieben, wurden nach dem Waschen die inkubierten Schnitte mit Filterpapier vom Objektträger abgenommen und die totale und unspezifische Bindung im Gewebe mittels γ -Counter bestimmt. In jedem Versuchsdurchgang wurden gelatinierte Objektträger ohne Gewebeschnitte zur Bestimmung der Glasbindung mitgeführt. Am Ende des Waschvorgangs wurde mit Filterpapier eine ca. 2 cm² große Fläche des Objektträgers abgewischt. Die Radioaktivität des Filterpapiers wurde ebenfalls im γ -Counter gemessen.

B. 5. 9. 3. 2. Bestimmung der optimalen Inkubationszeit

Bevor die quantitative Analyse der VIP-Rezeptoren im Dünndarm durchgeführt wurde, mußte die optimale Inkubationszeit bestimmt werden. Der Versuchsaufbau entsprach der im *Kapitel B. 5.* beschriebenen Methode. Zu den Zeitpunkten 15 Min., 30 Min., 60 Min., 120 Min. und 180 Min. wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten aus dem Inkubationsmedium entfernt und nach Messung im γ -Counter die spezifische Bindung bestimmt.

Zur Bestimmung der optimalen Inkubationszeit wurde der Proteingehalt der Gewebeschnitte ermittelt, um die im γ -Counter gemessenen Werte auf die eingesetzte Gewebemenge beziehen zu können. Die quantitative Proteinbestimmung erfolgte nach der Bradford-Methode.

Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford:

- Untersuchungsmaterial
 - Dünndarmbiopsien der Patienten, die mittels der unter *B. 4. I.* beschriebenen Methode gewonnen wurden.
- Verbrauchsmaterial
 - Eppendorfgeläße
 - Microtiterplatte Greiner F (Vertrieb Boll, D-München)
- Geräte
 - Plattenphotometer (Dynatech, D-Denkendorf)

– Ultraschall Sonifier B-10-L (Branson Sonic Power Co., USA-Danbury, CT)

- Reagenzien

– 0.5 M NaOH

– Standard-Protein-Microassay (Bio-Rad, D-München)

– BSA (Sigma, D-Deisenhofen),

- Durchführung

Zunächst mußte eine Standardkurve bestimmt werden. Dazu wurde 1 mg BSA in 1 ml Aqua bidest. gelöst, gemischt und eine Protein-Verdünnungsreihe erstellt, die im Photometer vermessen wurde.

Während des Schneidens der Gewebeproben wurden von jeder Biopsie je 4 Schnitte in vorgekühlte Eppendorfgefäße gegeben und bis zur Proteinbestimmung bei -80°C aufbewahrt. Zur Proteinbestimmung wurden 200 µl 0.3 molare NaOH in die Eppendorfgefäße pipettiert, vermischt und das Gewebe 2 Min. mit Ultraschall aufgelöst. Für die Messung im Photometer wurden davon 20 µl in eine Küvette pipettiert und 750 µl Bredford-Lösung dazugegeben. Nach Vermischen konnte nach 2 Min. die Messung im Photometer erfolgen. Anhand der zuvor erstellten Eichkurve konnte der Proteingehalt ermittelt werden.

B. 5. 9. 4. Evaluierung der biochemischen Ligand-Rezeptorbindung

Bei Rezeptor-Ligandenstudien muß sichergestellt sein, daß der Ligand an seinem spezifischen Rezeptor bindet. Die biochemische Definition eines Rezeptors fordert die direkte und selektive Bindung eines Agonisten. Diese Bindung muß sättigbar, spezifisch und reversibel sein.

B. 5. 9. 4. 1. Äquilibriumsbinding

Rezeptoren müssen sättigbar sein, da jedes Gewebe nur eine bestimmte, endliche Anzahl an Rezeptoren besitzt. Das heißt, daß ab einer bestimmten Menge von zugegebenen Liganden alle Rezeptoren mit Liganden besetzt sind und die Assoziationsreaktion mit der Dissoziationsreaktion im Gleichgewicht (Äquilibrium) steht. Um die Sättigbarkeit der Rezeptoren zu zeigen, muß sich ab einer bestimmten Ligandenkonzentration eine konstante spezifische Bindung einstellen.

Der Versuchsaufbau entspricht der im *Kapitel B. 5.* beschriebenen Methode. Es wurden nun steigende Konzentrationen von 2.5 pM $^{125}\text{J-VIP}$ bis 80 pM im Inkubationspuffer eingesetzt.

Unter identischen Versuchsbedingungen wie unter *B. 5.* beschrieben, wurden nach dem Waschen die inkubierten Schnitte mit Filterpapier vom Objektträger abgenommen und die totale und unspezifische Bindung im Gewebe mittels γ -Counter bestimmt.

Der Proteingehalt der Gewebeschnitte wurde nach der in *Kapitel B. 5. 9. 3. 2.* beschriebenen Methode ermittelt.

B. 5. 9. 4. 2. Reversibilität der Ligandenbindung

Eine weitere Eigenschaft einer biochemisch intakten Ligand-Rezeptorbindung ist die Reversibilität dieser Bindung. Konkurrieren zwei Liganden mit der gleichen Bindungsaffinität zu einem Rezeptor, so verdrängt der in höherer Konzentration vorliegende Ligand den in niedrigerer Konzentration vorliegenden Liganden aus der Ligand-Rezeptorbindung. Für den Nachweis der Reversibilität wurden die zwei Liganden VIP und $^{125}\text{J-VIP}$ verwendet.

Der Versuchsaufbau entspricht der im *Kapitel B. 5.* beschriebenen Methode. Es wurde zunächst eine Inkubation von 20 Objektträgern mit je 3 Schnitten humanem Duodenalgewebe mit 37.5 pM $^{125}\text{J-VIP}$ über 180 Min. durchgeführt. Nach 180 Min. wurde bei vier Objektträgern (12 Gewebeschnitte) die totale Bindung mit dem γ -Counter bestimmt. Im Inkubationsmedium verblieben 16 Objektträger. Nun wurde zum Inkubationsmedium 2.91 μM VIP zugegeben. Nach 10 Min., 30 Min., 50 Min. und 80 Min. erfolgten Messungen der verbliebenen $^{125}\text{J-VIP}$ -Aktivität im Gewebe mittels γ -Counter.

B. 5. 9. 4. 3. Spezifität der $^{125}\text{J-VIP}$ -Bindung

Neben der Sättigbarkeit und der Reversibilität einer Ligand-Rezeptorbindung muß die Spezifität der Bindung nachgewiesen werden. Die Ligand-Rezeptorbindung darf von Peptiden, die keine Affinität zum spezifischen Rezeptor besitzen nicht beeinflusst werden. Liganden, die eine bestimmte Affinität zum Rezeptor besitzen, müssen die Ligand-Rezeptorbindung beeinflussen.

Von Sekretin ist eine Teilaffinität zum VIP-Rezeptor der Enterozyten bekannt (Salomon, 1993). Wird eine hohe Menge Sekretin zum $^{125}\text{J-VIP}$ -Bindungsassay zugegeben, muß es zu einer Abnahme der $^{125}\text{J-VIP}$ -Bindung am VIP-Rezeptor kommen.

Substanz P, ein weiteres Mitglied der „gut-hormon“-Familie, besitzt keine Affinität zum VIP-Rezeptor (Gespach, 1985). Die Bindung von $^{125}\text{J-VIP}$ an den VIP-Rezeptor muß durch die Zugabe von Substanz P, auch in hohen Konzentrationen, unbeeinflusst bleiben.

Wird VIP in hohen Konzentrationen zum ^{125}J -VIP-Bindungsassay zugegeben, muß sich eine Verdrängung von ^{125}J -VIP aus der Rezeptorbindung nachweisen lassen, die ungefähr der unspezifischen Bindung entspricht.

Der Versuchsaufbau entspricht der in *B. 5.* beschriebenen Methode. Substanz P und Sekretin wurden von der Fa. Bissendorf (Saxon Biochemicals, D-Hannover) bezogen. Es wurden den ^{125}J -VIP-Inkubationsmedien jeweils Substanz P, Sekretin und VIP in ansteigenden Konzentrationen zugesetzt und nach 180 Min. Inkubation die Aktivität der Gewebeschnitte im γ -Counter bestimmt.

C. Ergebnisse

C. 1. Daten der Patienten

C. 1. 1. Klinische Daten der Patienten

In *Kapitel B. 1.* wurden die Auswahlkriterien für die Studienteilnehmer beschrieben. 14 Patienten wurden zunächst für die Studie ausgewählt. Zwei Patienten standen nur für eine Biopsie zur Verfügung. Die Biopsate von zwei Patienten waren so klein, daß sie nur für die Untersuchung zum Ausschluß einer Zöliakie und für die histologische Begutachtung im Institut für Pathologie der LMU-München verwendet werden konnten und somit nicht für die Bestimmung der VIP-Rezeptorendichte zur Verfügung standen.

Von 10 Patienten existierte somit eine Biopsie unter Provokation und unter Diät für die hier dargestellte Studie.

In *Tab. 8* werden die klinischen Daten der 10 Studienteilnehmer dargestellt.

Klinische Daten der Patienten	
Anzahl der Studienteilnehmer:	10 Patienten davon weiblich: 2 Patientinnen davon männlich: 8 Patienten
Durchschnittliches Alter der Studienteilnehmer:	8.5 Jahre (6-12 Jahre)
Durchschnittliche Dauer der ADHD-Symptome:	8.1 Jahre (5-12 Jahre)
Durchschnittliche Anzahl der erfüllten DSM III R-Kriterien:	9.4 Punkte (8-13)
Durchschnittliche Anzahl der Tage pro Woche mit Conners Scores > 14:	2.5 Tage (1-5)
<u>Zusätzliche Symptome:</u>	
Anzahl der Patienten mit rezidivierenden Kopfschmerzen:	5 Patienten
Anzahl der Patienten mit rezidivierenden gastrointestinalen Beschwerden:	10 Patienten

Tab. 8

C. 1. 2. Provozierende Nahrungsmittel bei den Studienteilnehmern

Wie im *Kapitel B. 2.* ausführlich dargestellt, wurden die provozierenden Nahrungsmittel in der Reintroduktionsphase identifiziert.

Alle bei einem Patienten als provozierend erkannten Nahrungsmittel, Konservierungs- und Farbzusätze wurden insgesamt dreimal für fünf Tage nach mehrwöchigen Auswaschphasen auf ihre reproduzierbare verhaltensbeeinflussende Wirkung getestet.

Folgende Nahrungsmittel bzw. Nahrungszusätze zeigten auslösenden oder verstärkenden Einfluß auf die Symptome des hyperkinetischen Syndroms der Studienteilnehmer:

- Kuhmilch
- Tomaten
- Weizen
- Roggen
- Rübenzucker
- Farb- u. Konservierungszusätze
- Schweinefleisch
- Fisch
- Eier
- Nüsse
- Schokolade
- Kakao
- Zitrusfrüchte

Tab. 9 zeigt, wieviele Patienten auf das jeweilige Nahrungsmittel reagierten.

Anzahl der auf ein bestimmtes Nahrungsmittel reagierenden Studienteilnehmer n = 10	
Kuhmilch	6
Rübenzucker	6
Weizen	5
Schweinefleisch	3
Farb- u. Konservierungszusätze	3
Tomaten	3
Eier	3
Schokolade	3

Roggen	1
Zitrusfrüchte	1
Nüsse	1
Fisch	1
Kakao	1

Tab. 9

C. 1. 3. Einfluß der Diät auf das Verhalten

Während der Studienphase wurden von Eltern, Lehrern oder Kindergärtnern täglich die Conners Verhaltensskalen ausgefüllt.

Alle Patienten zeigten unter Diät deutlich niedrigere Punktwerte als unter Provokation (Tab. 10).

Auch die Anzahl der Tage, an denen die Kinder eindeutig hyperaktives Verhalten zeigten (Conners Score mehr als 14 Punkte), war unter Diät deutlich niedriger (Tab. 10).

Einfluß der Diät auf die Conners Verhaltensskala (n = 10)		
	<u>ohne Diät</u>	<u>mit Diät</u>
Wöchentliche Conners Scores (Median)	15.7	5
Conners Scores > 14 Punkte (Mittel) (Tage pro Woche)	2.5	0.1

Tab. 10

Zusätzliche Symptome:

5 Studienteilnehmer litten unter gewohnter Ernährung an Kopfschmerzen, 10 Studienteilnehmer klagten über rezidivierende gastrointestinale Beschwerden. Unter Diät konnte ein völliges Verschwinden beider Symptome beobachtet werden.

C. 2. Ergebnisse der Vorversuche zur Optimierung und Qualitätssicherung der autoradiographischen Methode

C. 2. 1. Nachweis der biochemischen Intaktheit von VIP und ^{125}J -VIP durch High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)

C. 2. 1. 1. Nachweis der biochemischen Intaktheit von VIP vor Inkubation

Wie im Kapitel B. 5. 9. 1. beschrieben, wurde vor jeder autoradiographischen Untersuchung der Patientenbiopsien das verwendete VIP durch High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) auf seine Reinheit und Degradationsprodukte hin analysiert.

Abb. 10 zeigt die Absorptionskurve bei biochemisch intaktem VIP. Deutlich läßt sich bei Min. 30 ein steiler Absorptionsanstieg erkennen.

Wenn VIP als eindeutiger peak im Zeitraum von 30-31 Min. des Durchlaufs im Photometer identifiziert werden konnte und keine Verunreinigungen vorlagen, wurde das VIP-Reagenz für die Autoradiographie verwendet.

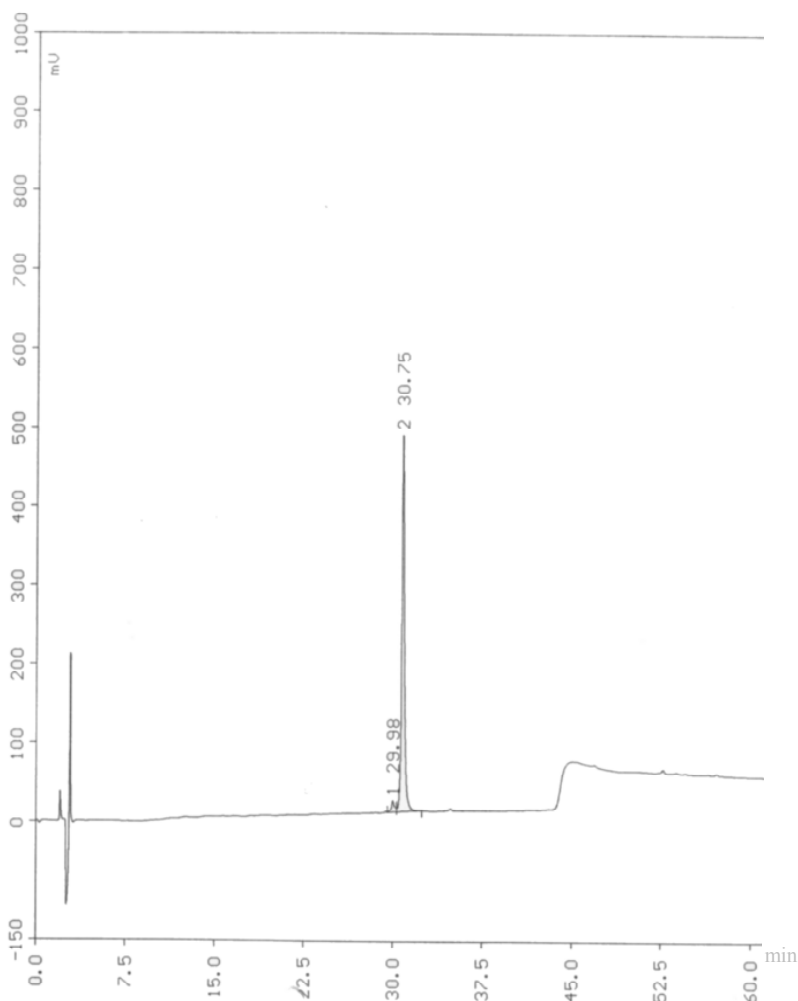


Abb. 10: Nachweis von biochemisch intaktem VIP durch HPLC

C. 2. 1. 2. Nachweis der biochemischen Intaktheit von [3-Iodotyrosyl-I125] Vasoactive Intestinal Polypeptide (¹²⁵J-VIP) vor Inkubation

Wie VIP wurde auch ¹²⁵J-VIP vor jedem Autoradiographieversuch mit Patientengewebe auf die biochemische Intaktheit und auf Verunreinigungen mit HPLC überprüft. Wie unter B. 5. 9. 1. beschrieben, wurden nach dem Säulendurchlauf die Flüssigkeitsfraktionen in einminütigem Abstand über 90 Min. gesammelt und dann die 90 Sammelröhrchen im γ -Counter vermessen.

Konnte ein eindeutiger Aktivitätspeak im Zeitraum von 39-41 Min. gemessen werden und fanden sich keine Verunreinigungen, wurde das Reagenz ¹²⁵J-VIP aus der die Probe stammte für die Autoradiographie verwendet (Abb. 11). Der geringe Aktivitätsanstieg bei Min. 3 stellt den freien ¹²⁵J-Anteil dar.

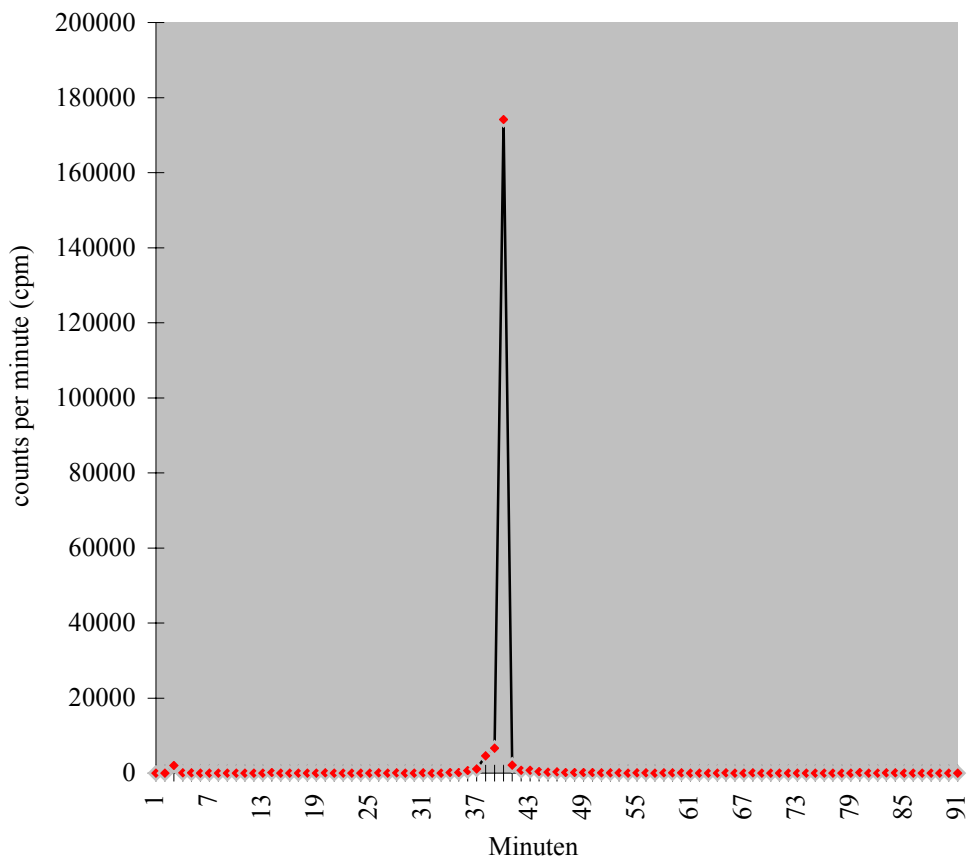


Abb.11: Nachweis von biochemisch intaktem, nicht verunreinigtem ¹²⁵J-VIP durch HPLC

Um sicherzustellen, daß degradiertes $^{125}\text{J-VIP}$ mit der verwendeten Methode detektiert wird, führten wir nach identischer Versuchsmethode eine HPLC mit $^{125}\text{J-VIP}$ durch, das in Aqua bidest. gelöst, 24 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt worden war. Es fand sich ein breitbasiger Aktivitätsanstieg zwischen Min. 31 und 66. Auch war der Anteil des freien ^{125}J bei Min. 3 wesentlich höher (Abb. 12).

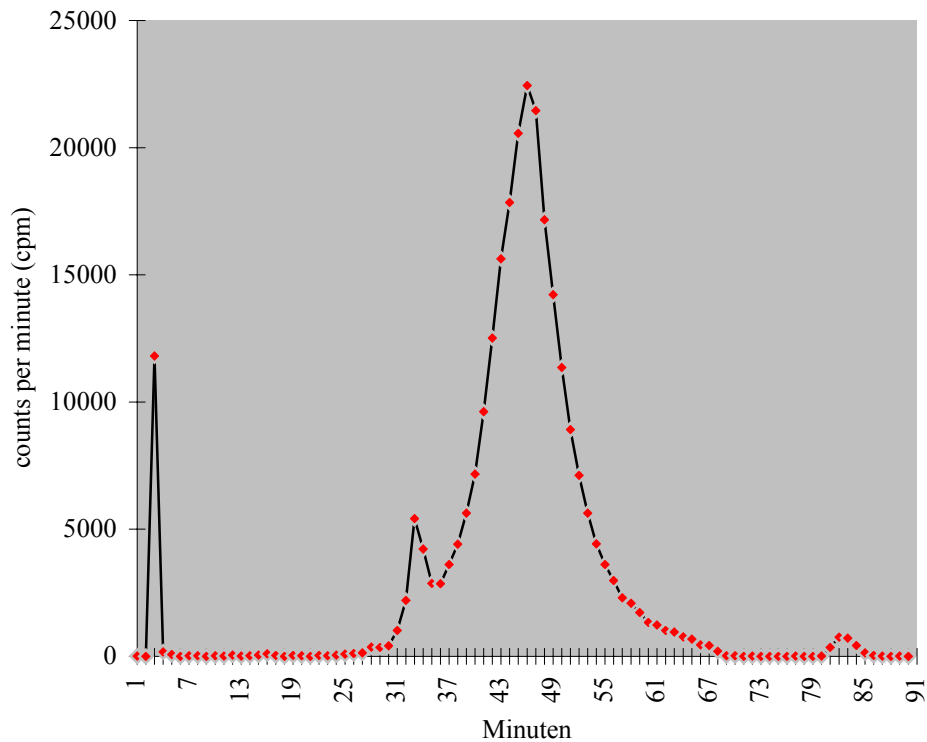


Abb.12: Nachweis von degradiertem $^{125}\text{J-VIP}$ durch HPLC

C. 2. 1. 3. Nachweis der Stabilität von [3-Iodotyrosyl-I125] Vasoactive Intestinal Polypeptide ($^{125}\text{J-VIP}$) nach 200 Minuten Inkubation

Die Gewebeschnitte wurden 180 Min. mit $^{125}\text{J-VIP}$ inkubiert. Nach jedem autoradiographischen Versuch mußte sichergestellt werden, daß $^{125}\text{J-VIP}$ bis zum Ende der Inkubation (180 Min.) noch in biochemisch intakter Form vorhanden war. Es wurde daher 20 Min. nach Beendigung der Inkubation 50 µl Inkubationspuffer nach der in B. 5. 9. 2. beschriebenen Methode durch HPLC auf Degradationsprodukte hin untersucht. Wie zu erwarten, fand sich eine geringere Aktivität als vor Inkubationsbeginn, da ein gewisser Anteil des $^{125}\text{J-VIP}$ im Gewebe gebunden worden war. Degradationsprodukte wurden nach keinem Versuch nachgewiesen. Somit war sichergestellt, daß $^{125}\text{J-VIP}$ bis zum Ende der Inkubation in stabiler Form vorhanden war (Abb.13).

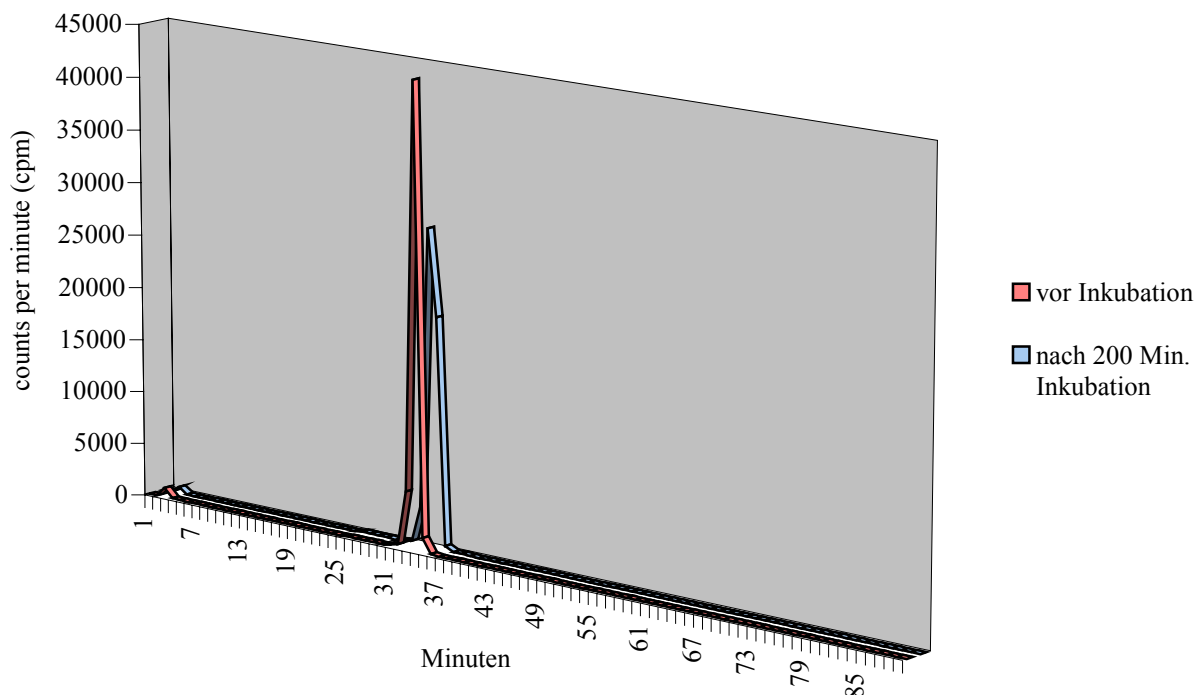


Abb. 13: Nachweis der Stabilität von $^{125}\text{J-VIP}$ nach 200 Min. Inkubation durch HPLC

C. 2. 2. Bestimmung der optimalen Polyethylenaminkonzentration im Präinkubationspuffer

Wie im *Kapitel B. 5. 9. 3. 1.* erläutert, war aufgrund der zu Beginn der Versuche auffallend hohen ^{125}J -VIP-Glasbindung die Zugabe von Polyethylenamin in den Präinkubationspuffer zur Verminderung der negativen elektrischen Ladung der Glasobjektträger notwendig.

Ziel der Versuchsreihen mit verschiedenen Polyethylenaminkonzentrationen war es, die Polyethylenaminkonzentration zu bestimmen mit der eine maximale Verminderung der ^{125}J -VIP-Glasbindung und eine minimale Beeinflussung der spezifischen Bindung erreicht werden konnte. Die Versuchsdurchführung wurde im *Kapitel B. 5. 9. 3. 1.* beschrieben.

Abb. 4 zeigt die von der Polyethylenaminkonzentration abhängigen Veränderungen der spezifischen Bindung von ^{125}J -VIP im Gewebe.

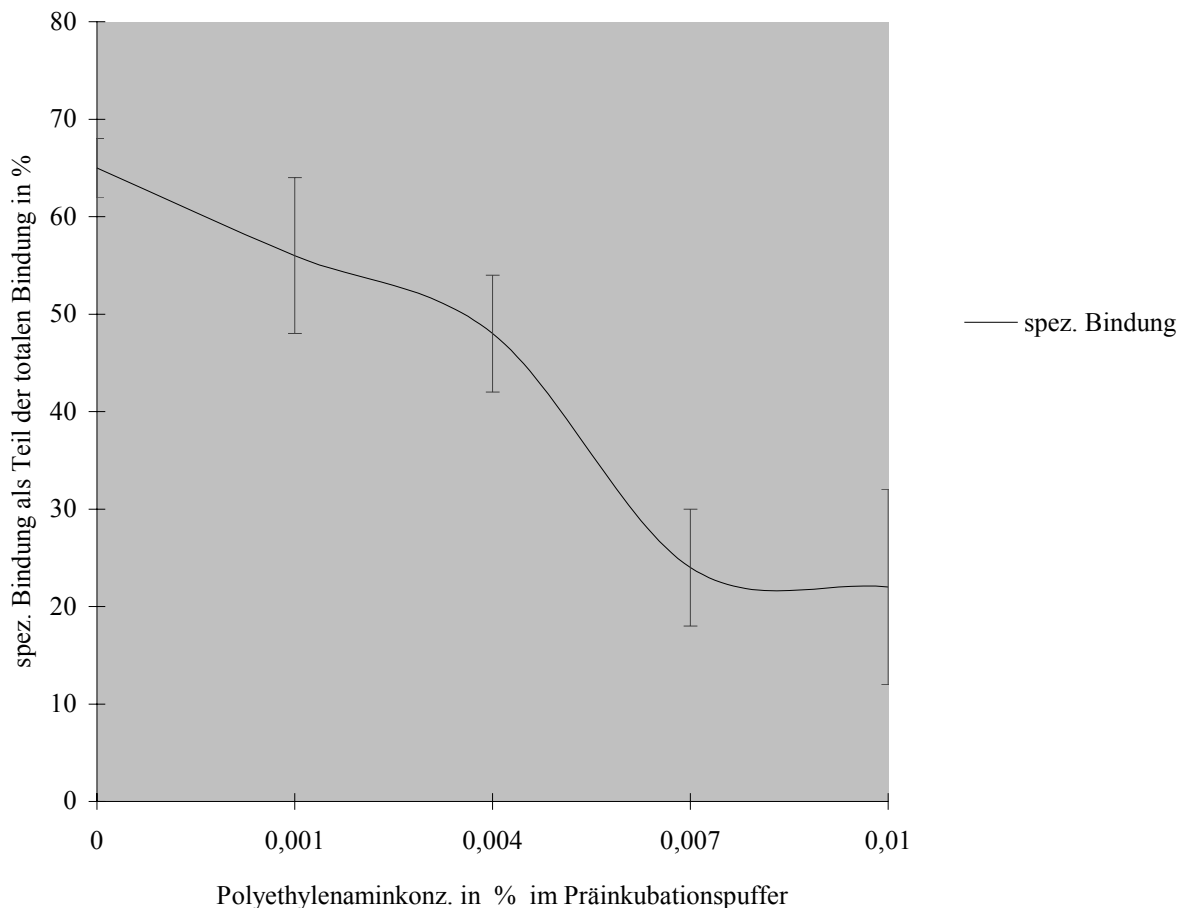


Abb. 14: Veränderung der spezifischen Bindung bei unterschiedlichen Polyethylenaminkonzentrationen im Präinkubationspuffer

Wie aus Abb. 14 ersichtlich, wird bereits bei einer Polyethylenaminkonzentration von 0.001% im Präinkubationspuffer die spezifische Bindung von ^{125}J -VIP im Gewebe um 9% vermindert.

Abb. 15 zeigt die Abnahme der ^{125}J -VIP-Bindung am Glasobjektträger bei zunehmender Polyethylenaminkonzentration im Präinkubationspuffer.

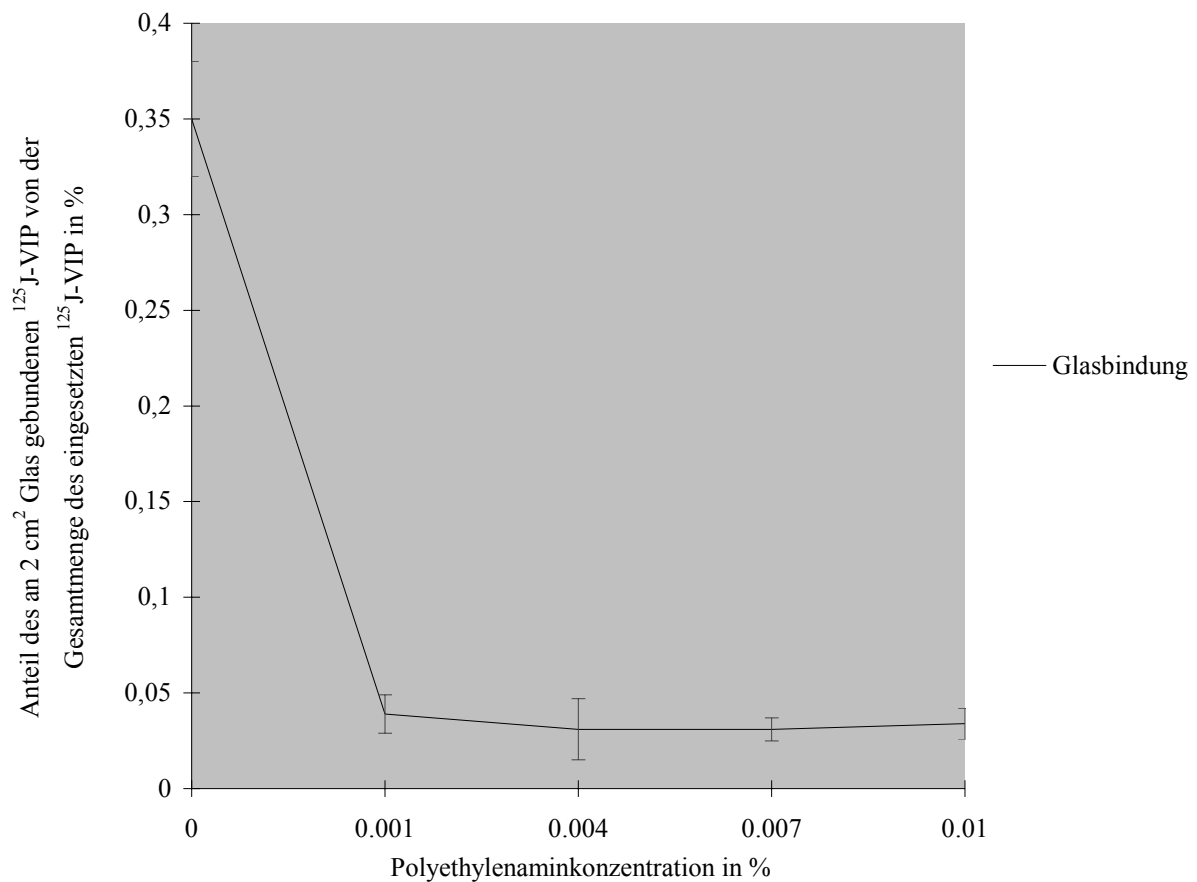


Abb. 15: Abnahme der ^{125}J -VIP-Glasbindung bei zunehmender Polyethylenaminkonzentration im Präinkubationspuffer

Bereits eine Konzentration von 0.001% Polyethylenamin im Präinkubationspuffer konnte die ^{125}J -VIP-Glasbindung um fast 90% senken. Mit höheren Polyethylenaminkonzentrationen konnte keine weitere signifikante Verminderung der Glasbindung erreicht werden.

Wir entschieden uns für eine Polyethylenaminkonzentration von 0.001% im Präinkubationspuffer, da bei dieser Konzentration bereits eine deutliche Reduzierung der ^{125}J -VIP-Glasbindung gelang und der negative Einfluß des Polyethylenamins auf die spezifische Bindung am geringsten war.

C. 2. 3. Bestimmung der optimalen Inkubationszeit

Ziel des in B. 5. 9. 3. 2. beschriebenen Versuches war es, die notwendige Inkubationsdauer für eine konstante spezifische Bindung im Gewebe zu bestimmen.

Abb. 16 zeigt, daß erst nach 30 Min. Inkubation mit $^{125}\text{J-VIP}$ eine deutliche spezifische Bindung zu messen ist. Bis zu einer Inkubationsdauer von 60 Min. steigt die spezifische Bindung als Zeichen einer zunehmenden Ligand-Rezeptorbindung an. Ab Min. 60 wird allerdings ein Plateau der spezifischen Bindung erreicht. Ab diesem Zeitpunkt sind alle VIP-Rezeptoren mit $^{125}\text{J-VIP}$ besetzt und es hat sich ein Äquilibrium eingestellt. Aus dieser Untersuchung geht ebenfalls hervor, daß auch eine Inkubationsdauer von 180 Min. die spezifische Bindung nach Erreichen des Plateaus (Min. 60) nicht beeinflusst.

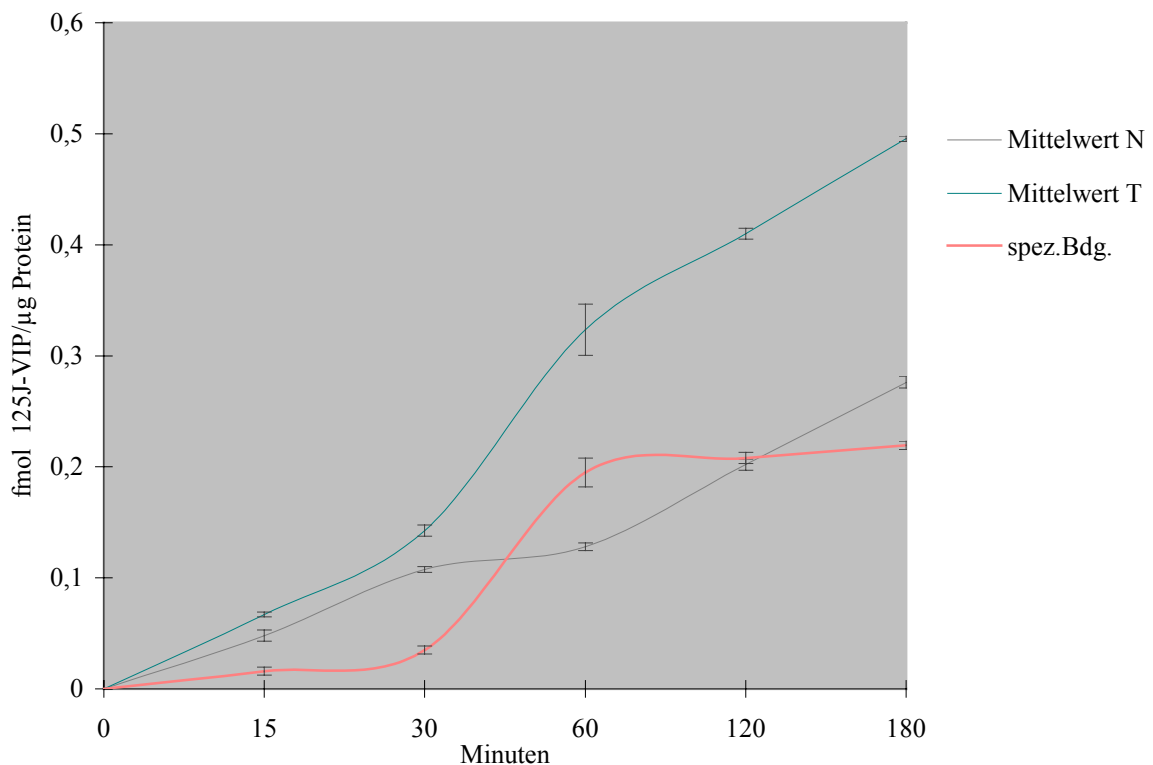


Abb. 16: Abhängigkeit der spezifischen Bindung von der Dauer der $^{125}\text{J-VIP}$ -Inkubation

Da pro autoradiographischem Versuch zur Vermeidung von Artefakten alle Biopsien der Patienten untersucht werden sollten, war aus technischen Gründen eine möglichst lange Inkubationszeit notwendig. Da wir zeigen konnten, daß auch nach 180 Min. Inkubationsdauer eine optimale spezifische Bindung nachzuweisen war, wurde für unsere Versuche eine Inkubationszeit von 180 Min. gewählt.

C. 2. 4. Bestimmung der Äquilibriumsbinding

Rezeptoren müssen durch den zugegebenen Liganden sättigbar sein, da jedes Gewebe eine endliche Anzahl an Rezeptoren des jeweiligen Liganden besitzt. Ab einer bestimmten Konzentration von zugegebenem Liganden muß sich daher eine Sättigung der Rezeptoren nachweisen lassen. Diese ist abhängig von der Affinität des Rezeptors zu seinem Liganden. Die Versuchsdurchführung wurde in B. 5. 9. 4. 1. beschrieben. Die Ergebnisse des Versuchs zeigt Abb. 17.

Zunächst findet sich bei ansteigenden Konzentrationen von $^{125}\text{J-VIP}$ ebenfalls ein Ansteigen der spezifischen Bindung als Ausdruck der zunehmenden Bindungsanzahl von VIP-Rezeptoren und $^{125}\text{J-VIP}$. Ab einer $^{125}\text{J-VIP}$ -Konzentration von 37,5 pM zeigt sich ein Plateau der spezifischen Bindung und auch höhere $^{125}\text{J-VIP}$ -Konzentrationen führen zu keinem weiteren Ansteigen der spezifischen Bindung. Mit Erreichen der Plateaukurve hat sich an allen VIP-Rezeptoren ein Gleichgewicht zwischen Ligandenassoziation und Ligandendissoziation eingestellt, die Rezeptoren sind „gesättigt“.

In unseren Versuchen wurde aufgrund dieser Ergebnisse $^{125}\text{J-VIP}$ in einer Konzentration von 37,5 pM eingesetzt.

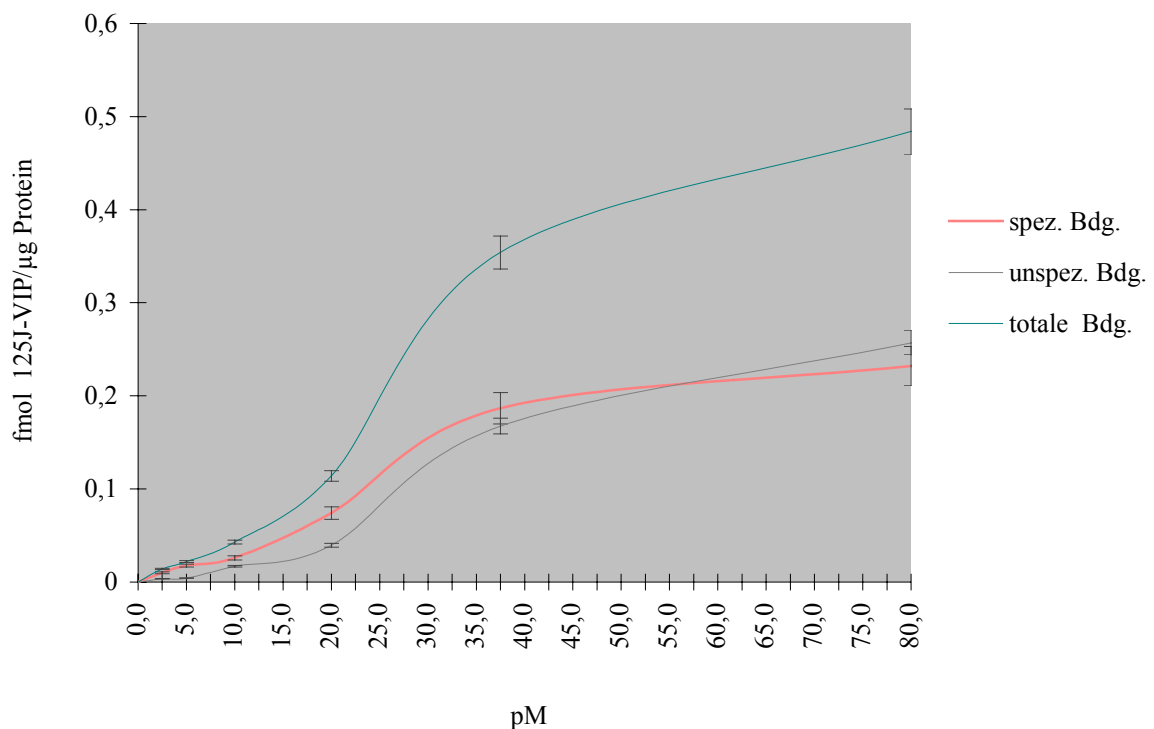


Abb. 17: Äquilibrium der VIP-Rezeptoren bei steigenden $^{125}\text{J-VIP}$ -Konzentrationen im Inkubationspuffer

C. 2. 5. Reversibilität der Ligandenbindung

Wie in *Kapitel B. 5. 9. 4. 2.* bereits beschrieben, muß die Ligand-Rezeptorbindung reversibel sein. Die Ergebnisse des ebenfalls in diesem Kapitel beschriebenen Versuchs stellt *Abb. 18* dar. Bereits 10 Min. nach der Zugabe von 2.91 μM VIP läßt sich eine Verminderung der totalen Bindung um 36% messen als Ausdruck, daß das im hohen Überschuß vorhandene VIP ^{125}J -VIP aus der Rezeptorbindung verdrängt. Im weiteren zeitlichen Verlauf fällt die totale Bindung auf 29% ab. Dieser Wert entspricht somit der unspezifischen Bindung.

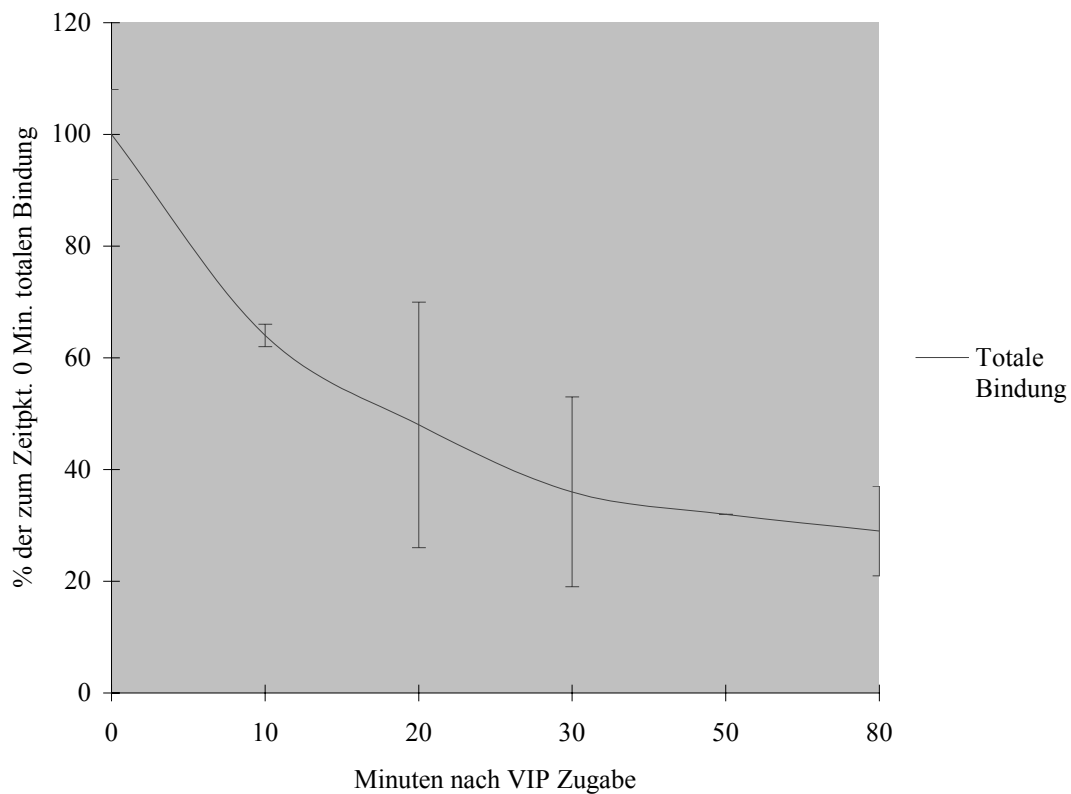


Abb. 18: Reversibilität der Ligandenbindung

C. 2. 6. Spezifität der $^{125}\text{J-VIP}$ -Bindung

Entsprechend den biochemischen Forderungen einer Ligand-Rezeptorbindung muß die $^{125}\text{J-VIP}$ -Bindung spezifisch sein. Wie im *Kapitel B. 5. 9. 4. 3.* beschrieben, besitzt Substanz P keine Affinität und Sekretin eine Teilaffinität zum VIP-Rezeptor. Ist die $^{125}\text{J-VIP}$ -Rezeptorbindung spezifisch, darf die $^{125}\text{J-VIP}$ -Rezeptorbindung durch Substanz P nicht und durch Sekretin nur zum Teil beeinflusst werden. Wird allerdings VIP, das die gleiche Rezeptoraffinität wie $^{125}\text{J-VIP}$ besitzt, in hohen Konzentrationen zugegeben, muß sich eine Verdrängung der $^{125}\text{J-VIP}$ -Rezeptorbindung zeigen. Die Versuchsdurchführung wurde in *Kapitel B. 5. 9. 4. 3.* dargestellt.

Abb. 19 stellt die Ergebnisse des Versuchs dar. Wurde Substanz P in hohen Konzentrationen dem Inkubationspuffer beigegeben, konnte keine Verminderung der $^{125}\text{J-VIP}$ -Rezeptorbindung nachgewiesen werden. Die Zugabe von steigenden Sekretinkonzentrationen verminderte die $^{125}\text{J-VIP}$ -Rezeptorbindung um maximal 21% als Zeichen der Teilaffinität zum VIP-Rezeptor. Wie bereits aus dem in *Kapitel C. 2. 5.* beschriebenen Versuch der Reversibilität der Ligandenbindung bekannt, wird durch die Zugabe von hohen Konzentrationen VIP, die $^{125}\text{J-VIP}$ -Rezeptorbindung um max. 70% verringert. Mit diesen Ergebnissen ist die Spezifität der $^{125}\text{J-VIP}$ -Rezeptorbindung nachgewiesen.

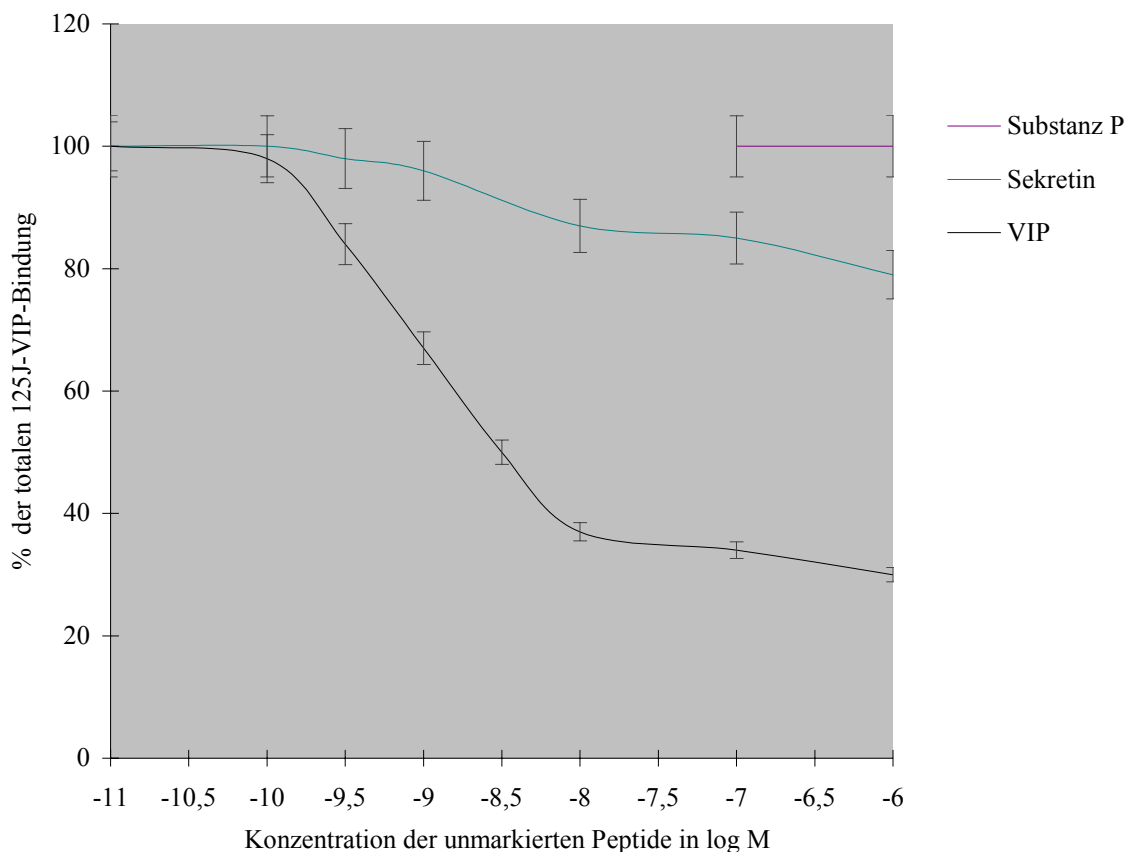


Abb. 19: Spezifitätsnachweis der $^{125}\text{J-VIP}$ -Rezeptorbindung unter Zugabe von Substanz P, Sekretin und VIP

C. 3. VIP-Rezeptorendichte im Dünndarm der untersuchten Patienten

Die Dünndarmbiopsien wurden entsprechend des in Abb. 20 dargestellten zeitlichen Studienablaufs entnommen.

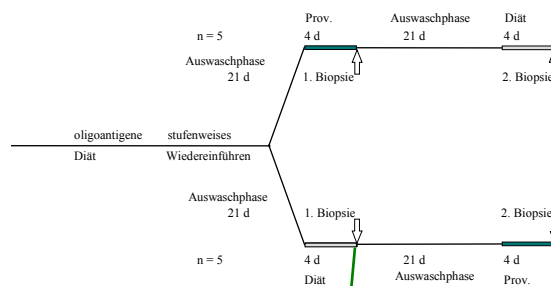


Abb. 20: zeitl. Studienablauf

Die Biopsien wurden aus der Flexura duodenojejunalis entnommen. Die Durchführung der Saugbiopsien war bei allen Patienten problemlos. Abb. 21 zeigt den Entnahmeort im Dünndarm.

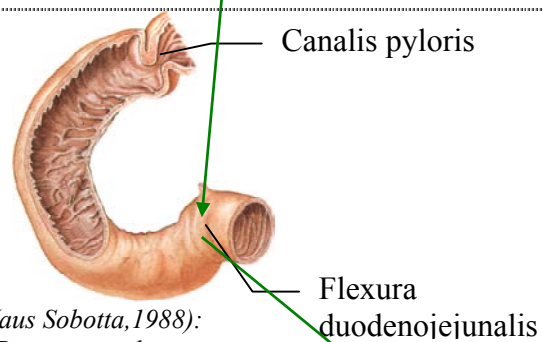


Abb. 21 (aus Sobotta, 1988): Biopsieentnahmeort

Abb. 22 stellt die mikroanatomischen Verhältnisse dar.

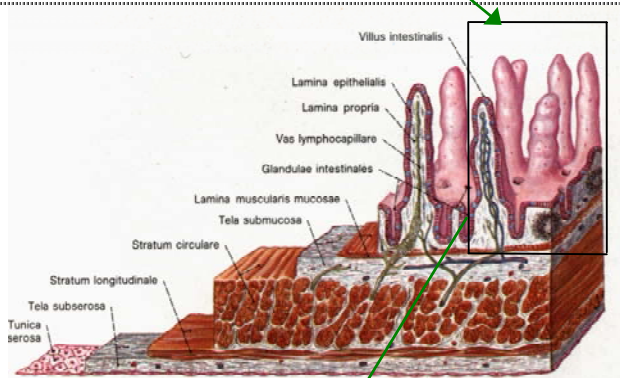


Abb. 22 (aus Sobotta, 1988): Mikroanatomie

Abb. 23 zeigt einen Teilausschnitt aus einer Studienpatienten-Saugbiopsie in HE-Färbung.



Abb. 23: Dünndarmzotten eines Patienten I

C. 3. 1. Nachweis der totalen und unspezifischen Bindung

Die Gewebeschnitte der Patienten wurden nach Durchführung der Mikroautoradiographie gefärbt (*Kapitel B. 5. 6.*) und zunächst auf Gewebeartefakte hin überprüft.

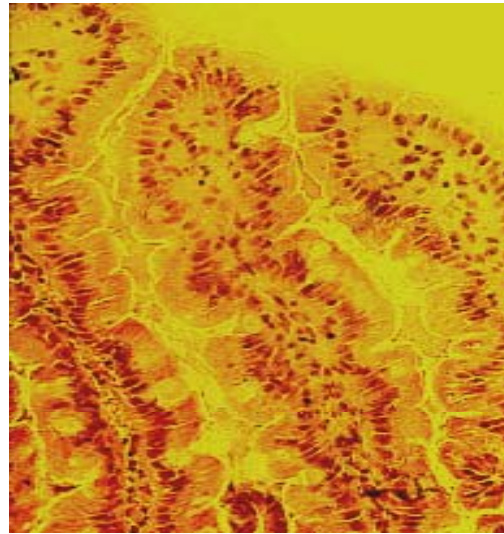


Abb. 24: Zotten eines Patienten in H.E.-Färbung II

Die folgenden Abbildungen zeigen die Gewebeschnitte in 400-facher Vergrößerung nach dem Entwicklungsprozeß. Als orange Körnchen sind die grains zu erkennen.

Abb. 25 stellt die totale Bindung und *Abb. 26* die unspezifische Bindung von $^{125}\text{J-VIP}$ an den Enterozyten dar.

Zur Verdeutlichung der Bindung wird der gleiche Gewebeausschnitt wie in *Abb. 25* nochmals im Dunkelfeld gezeigt (*Abb. 27*). Deutlich ist die Bindung des $^{125}\text{J-VIP}$ über den Enterozyten zu sehen.

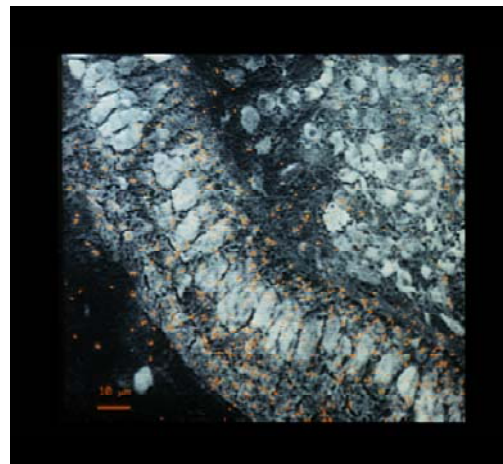


Abb. 25: totale Bindung

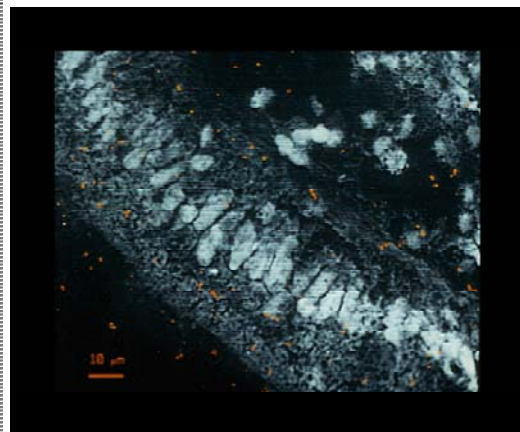


Abb. 26: unspezifische Bindung



Abb. 27: totale Bindung im Dunkelfeld

C. 3. 2. Histopathologische Untersuchung

Alle Biopsien wurden im gastroenterologischen Labor des Dr. v. Haunerschen Kinderspitals und im Pathologischen Institut der LMU-München untersucht. Bei keiner Biopsie fanden sich histopathologische Auffälligkeiten, insbesondere fanden sich bei keinem Patienten Hinweise auf das Vorliegen einer Zöliakie.

C. 3. 3. Statistische Auswertung der VIP-Rezeptorendichte unter Diät und unter Provokation

10 Patienten wurden im Crossover-Studiendesign untersucht. Somit standen 20 Biopsien (10 unter Diät, 10 unter Provokation) für die autoradiographische Untersuchung zur Verfügung. Jede Patientenbiopsie wurde in zwei unabhängigen Versuchsdurchläufen untersucht.

Pro Versuchsdurchlauf wurden von jeder Patientenbiopsie 16 Gewebeschnitte angefertigt (8 Gewebeschnitte für die totale Bindung und 8 Gewebeschnitte für die unspezifische Bindung). Die computerunterstützte quantitative Bestimmung der Rezeptorendichte erfolgte geblindet.

Pro Gewebeschnitt wurden mindestens 200 Enterozyten vermessen und die Silberkörnchenfläche bestimmt. Die spezifische Bindung spiegelt somit die Rezeptorendichte von mindestens 1600 Enterozyten pro Versuchsdurchlauf wider. Da zwei Versuchsdurchläufe stattfanden wurde die mittlere Rezeptorendichte eines Patienten unter Diät bzw. unter Provokation aus mindestens 3200 Enterozyten bestimmt.

Somit stand die prozentuale Silberkörnchendichte aus mindestens 3200 Enterozyten unter Diät der prozentualen Silberkörnchendichte aus mindestens 3200 Enterozyten unter Provokation zum Vergleich gegenüber.

Diese Werte wurden mit Hilfe des T-Testes verglichen. Signifikanz wurde bei einem $p < 0,05$ angenommen.

Der bei einer Crossover-Studie notwendige Ausschluß eines Überhangeffektes erfolgte durch die Varianzanalyse für Crossover-Design.

- 6 Patienten zeigten unter Diät eine signifikant höhere VIP-Rezeptorendichte als unter Provokation.
- 3 Patienten zeigten unter Diät ebenfalls einen Anstieg der VIP-Rezeptorendichte, jedoch war der Anstieg nicht signifikant.
- 1 Patient wies unter Provokation eine gering höhere VIP-Rezeptorendichte als unter Diät auf. Dieser Anstieg der VIP-Rezeptorendichte unter Provokation war jedoch nicht signifikant.

Abb. 28 zeigt die VIP-Rezeptorendichte aller Patienten unter Provokation und Diät. Unterscheidet sich die Rezeptorendichte zwischen Provokation und Diät signifikant, ist dies mit (s.) angegeben. Ein nicht signifikanter Unterschied wird mit (n.s.) angezeigt.

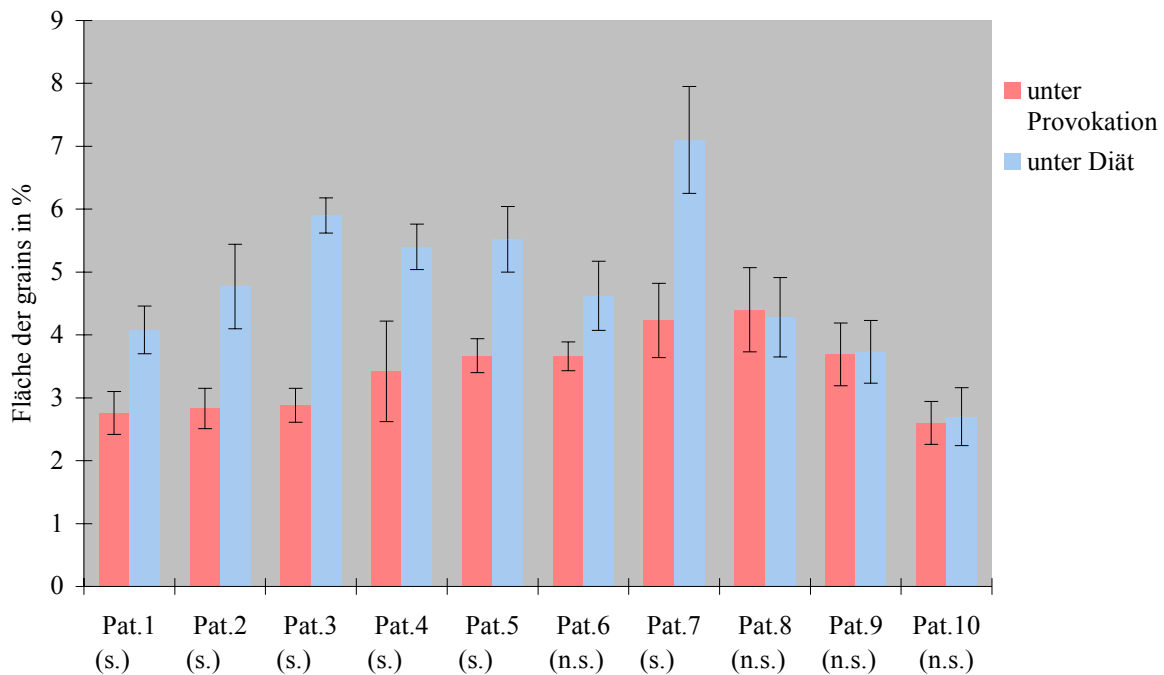


Abb. 28: VIP-Rezeptorendichte der Patienten unter Provokation und unter Diät

Ausgehend von der VIP-Rezeptorendichte unter Provokation zeigt *Abb. 29* die unter Diät angestiegene VIP-Rezeptorendichte der Studienteilnehmer. Dargestellt wird die prozentuale Differenz zwischen der VIP-Rezeptorendichte unter Provokation und der Rezeptorendichte unter Diät.

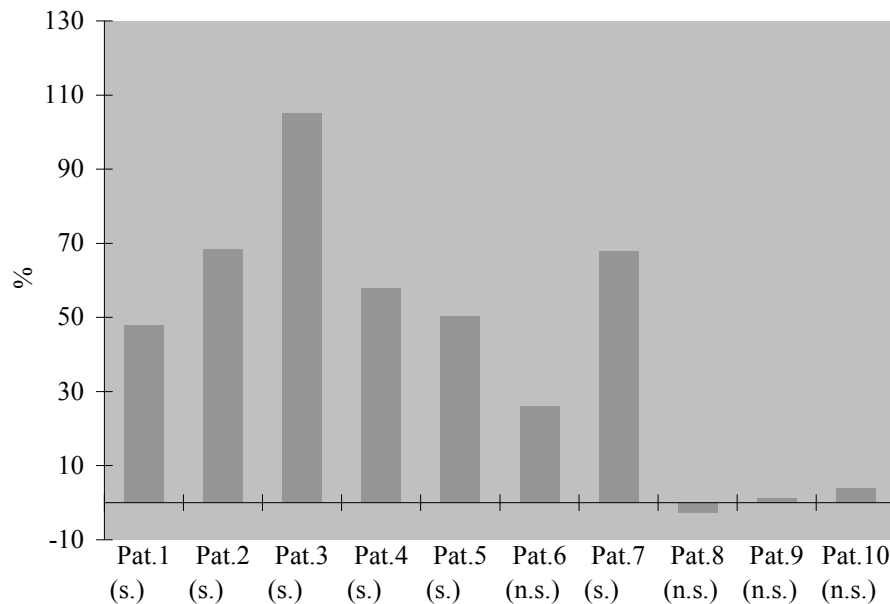


Abb. 29: Prozentuale Veränderung der VIP-Rezeptorendichte unter Diät im Vergleich zur Rezeptorendichte unter Provokation.

Bei neun von zehn Patienten zeigte sich unter Diät eine höhere Rezeptorendichte als unter Provokation.

Bei den sechs Patienten, deren Rezeptorendichte sich zwischen Diät und Provokation signifikant unterschied, fand sich unter Diät eine zwischen 48% und 105% höhere Rezeptorendichte als unter Provokation.

Die Patienten, deren Rezeptorendichte sich zwischen Diät und Provokation nicht signifikant unterschied, zeigten bis auf einen Patienten ebenfalls unter Diät eine zwischen 1.1% und 26.2 % höhere VIP-Rezeptorendichte als unter Provokation.

Nur bei einem Patienten der Studie wurde unter Provokation eine gering höhere Rezeptorendichte (2.7%) als unter Diät gemessen.

Unsere Untersuchung war als Crossover-Studie angelegt. Bei dieser Studienform werden mit zwei Perioden zwei „Behandlungen“ A (Diät) und B (Provokation) verglichen, indem jeder Patient beide „Behandlungen“ nacheinander erhält. Der Vorteil dieser Studienform besteht darin, daß jeder Patient als seine eigene Kontrolle dient (Lehmacher, 1987).

Nach Randomisierung wurden, wie in *Kapitel B. 3.* beschrieben, je 5 Patienten einem der beiden Studienarme zugeordnet. So wurde bei den 5 Patienten des einen Studienarmes (*Abb. 30, oberer Arm*) die erste Biopsie unter Provokation und nach einer 21-tägigen „wash-out“-Phase die zweite Biopsie unter Diät durchgeführt.

Bei den 5 Patienten des anderen Studienarmes (*Abb. 30, unterer Arm*) wurde die erste Biopsie unter Diät und nach einer 21-tägigen „wash-out“-Phase die zweite Biopsie unter Provokation entnommen.

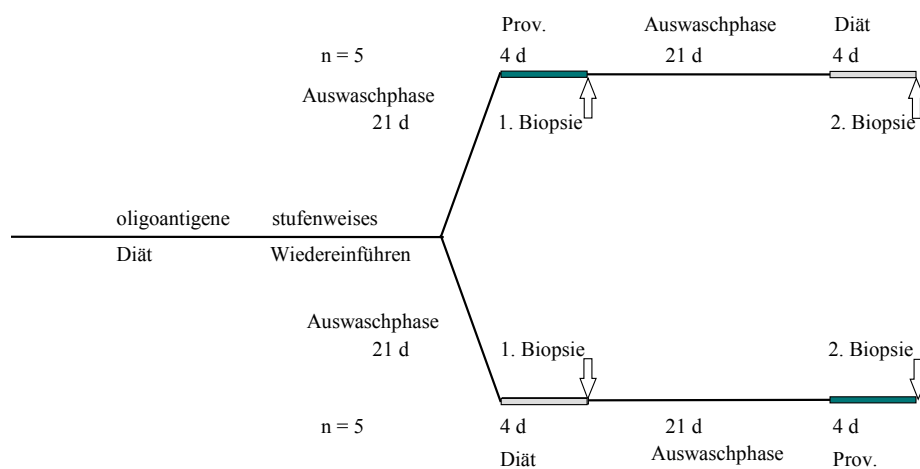


Abb. 30: Studiendesign

In *Abb. 31* wird die VIP-Rezeptorendichte der Patienten entsprechend ihrer Studienarmzuteilung dargestellt.

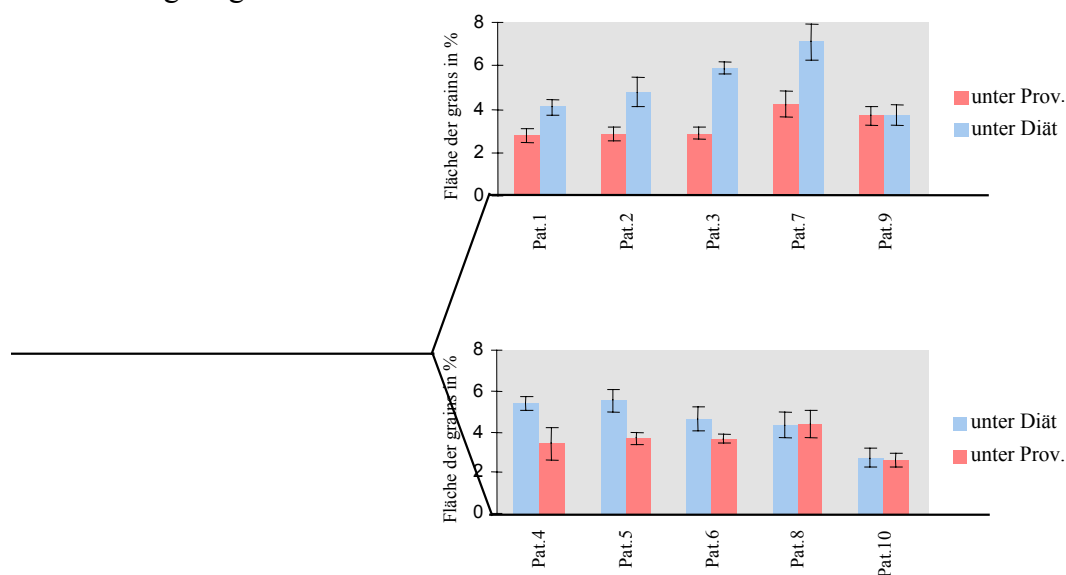


Abb. 31: VIP-Rezeptorendichte unter Provokation und Diät entsprechend der Studienarmaufteilung

Abb. 32 zeigt die Rezeptorendichte beider Perioden unter Behandlung A bzw. Behandlung B. In der ersten Periode (Prov. \Rightarrow Diät) ist bei vier von fünf Patienten ein deutlicher Anstieg der VIP-Rezeptorendichte unter Diät zu erkennen. Bei einem Patienten bleibt die Rezeptorendichte unter den beiden Behandlungsformen nahezu unverändert. In der zweiten Periode (Diät \Rightarrow Prov.) fällt bei drei von fünf Patienten unter Provokation die VIP-Rezeptorendichte deutlich ab. Ein Patient zeigt unter Provokation nur einen geringen Abfall in der Rezeptorendichte, während sich bei einem Patienten unter Provokation sogar ein geringer Anstieg der Rezeptorendichte (nicht signifikant) findet.

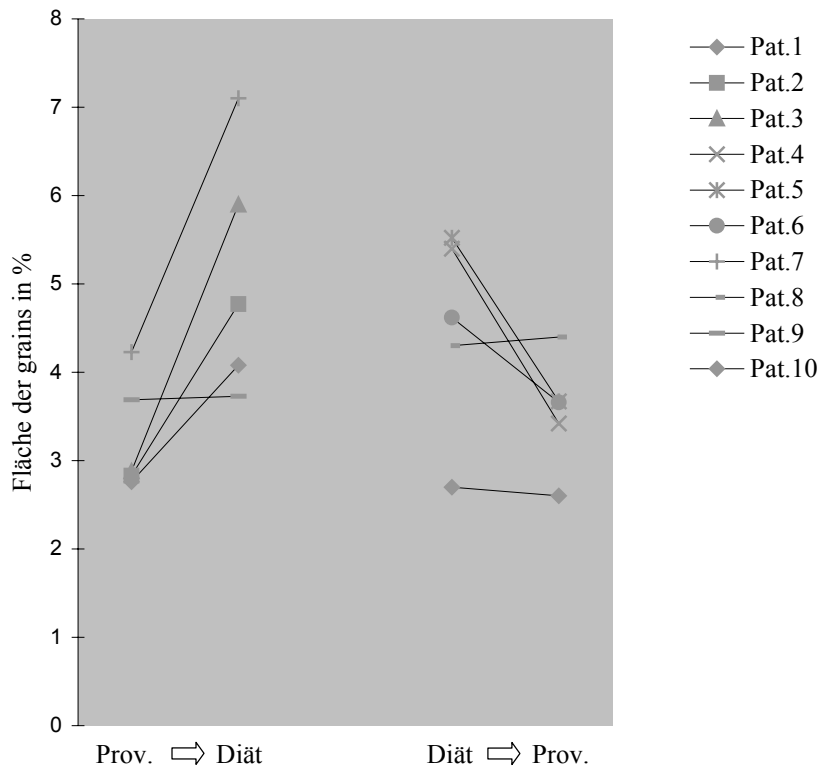


Abb.32: Veränderungen der Rezeptorendichte unter der ersten Periode (Prov. \Rightarrow Diät) und der zweiten Periode (Diät \Rightarrow Prov.)

Bei der Bewertung einer Crossover-Studie muß sichergestellt werden, daß kein Überhangseffekt vorliegt. Das heißt, Behandlung A darf Behandlung B bzw. Behandlung B darf Behandlung A nicht beeinflussen. Eine mögliche Ursache könnte in unserer Studie zum Beispiel eine zu kurz gewählte „wash-out“-Phase sein.

Die Varianzanalyse für Crossover-Design ergab in unserer Studie keinen Überhangseffekt ($p=0,76$).

Abb. 33 stellt die Mittelwerte der Rezeptorendichte unter der jeweiligen Behandlungsform dar.

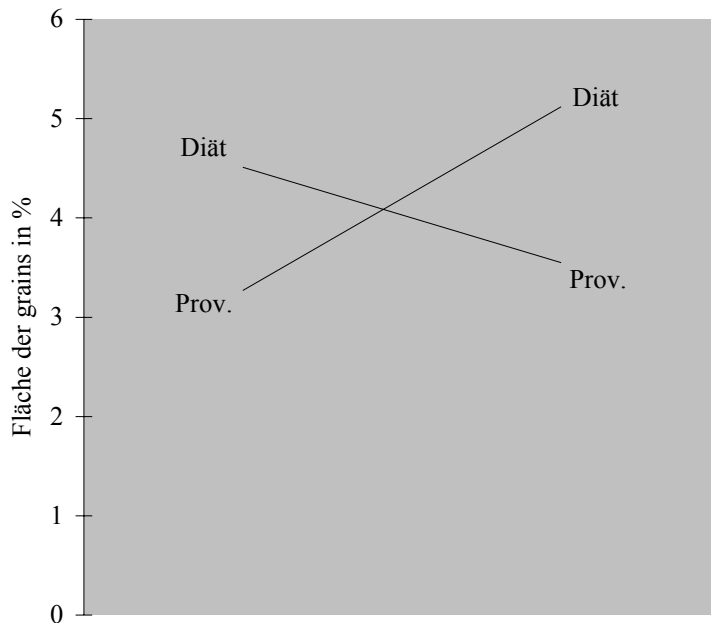


Abb. 33: Mittelwerte der Rezeptorendichte unter der jeweiligen Behandlungsform

Wird kein Überhangseffekt nachgewiesen, dürfen beide Zeitpunkte „gepoolt“ werden, um den Gesamtbehandlungseffekt zu ermitteln.

Bei den 10 untersuchten Patienten liegt die durchschnittliche VIP-Rezeptorendichte unter Provokation bei 3.41% Grainfläche und unter Diät bei 4.82% Grainfläche.

Der Unterschied der VIP-Rezeptorendichte unter Diät und unter Provokation ist hochsignifikant ($p=0.0038$).

Bei den in dieser Studie untersuchten Patienten konnte eine Beeinflussung der VIP-Rezeptorendichte im Dünndarm durch Diät nachgewiesen werden.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Patienten dargestellt.

Patient 1, N.H.:

- Alter zum Zeitpunkt der Biopsien: 13 Jahre
- Geschlecht: männlich
- 1. Biopsie: unter Provokation
- 2. Biopsie: unter Diät

Provozierendes Nahrungsmittel, das durch ein als nicht provozierend getestetes Nahrungsmittel hinsichtlich des Energiegehalts, der Verteilung von Protein, Kohlenhydrat, Fett, der Osmolarität und des Volumens ersetzt werden konnte:
Kuhmilch

Ersatz des provozierenden Nahrungsmittels durch:
Ziegenmilch, die bei diesem Patienten als nicht provozierend getestet wurde.

Fläche der grains bezogen auf die vermessene Zottenfläche (%):

unter Provokation: 2.76 (\pm 0.34) %
unter Diät: 4.08 (\pm 0.38) %

Signifikanz (t-Test): $p < 0.05$

Beurteilung:

- ausgewertet wurden ≥ 3200 histomorphologisch intakte Enterozyten pro Biopsie.
- unter Diät ist die VIP-Rezeptorendichte um 48 % höher als die Rezeptorendichte unter Provokation.
- der Anstieg der VIP-Rezeptorendichte unter Diät ist signifikant.

Abb. 34 stellt die VIP-Rezeptorendichte unter Provokation und unter Diät dar.

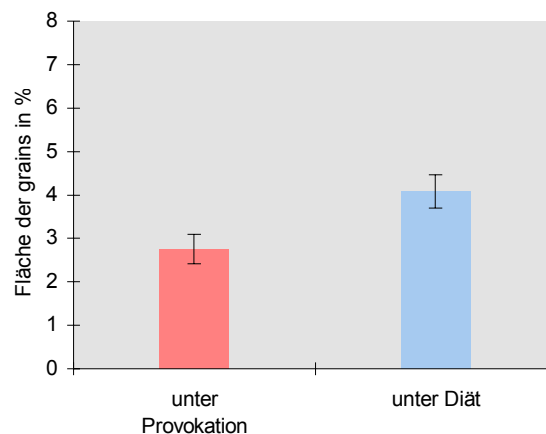


Abb. 34: VIP-Rezeptorendichte, Patient 1

Patient 2, D.S.:

- Alter zum Zeitpunkt der Biopsien: 13 Jahre
- Geschlecht: weiblich
- 1. Biopsie: unter Provokation
- 2. Biopsie: unter Diät

Provozierendes Nahrungsmittel, das durch ein als nicht provozierend getestetes Nahrungsmittel hinsichtlich des Energiegehalts, der Verteilung von Protein, Kohlenhydrat, Fett, der Osmolarität und des Volumens ersetzt werden konnte:
Weizen

Ersatz des provozierenden Nahrungsmittels durch:
Roggen, der bei dieser Patientin als nicht provozierend getestet wurde.

Fläche der grains bezogen auf die vermessene Zottenfläche (%):

unter Provokation: 2.83 (± 0.32) %
unter Diät: 4.77 (± 0.67) %

Signifikanz (t-Test): $p < 0.05$

Beurteilung:

- ausgewertet wurden ≥ 3200 histomorphologisch intakte Enterozyten pro Biopsie.
- unter Diät ist die VIP-Rezeptorendichte um 68.5 % höher als die Rezeptorendichte unter Provokation.
- der Anstieg der VIP-Rezeptorendichte unter Diät ist signifikant.

Abb. 35 stellt die VIP-Rezeptorendichte unter Provokation und unter Diät dar.

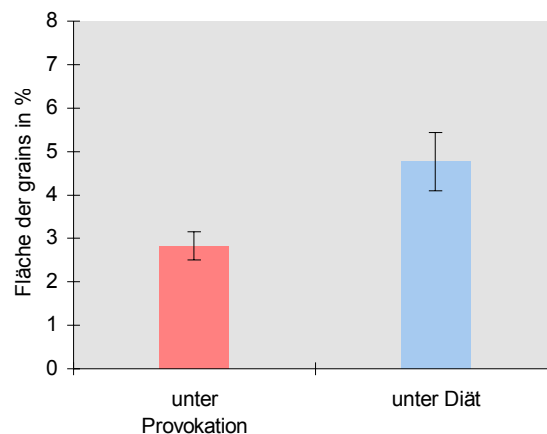


Abb. 35: VIP-Rezeptorendichte, Patient 2

Patient 3, K.M.:

- Alter zum Zeitpunkt der Biopsien: 10 Jahre
- Geschlecht: männlich
- 1. Biopsie: unter Provokation
- 2. Biopsie: unter Diät

Provozierendes Nahrungsmittel, das durch ein als nicht provozierend getestetes Nahrungsmittel hinsichtlich des Energiegehalts, der Verteilung von Protein, Kohlenhydrat, Fett, der Osmolarität und des Volumens ersetzt werden konnte:
Weizen

Ersatz des provozierenden Nahrungsmittels durch:
Roggen, der bei diesem Patienten als nicht provozierend getestet wurde.

Fläche der grains bezogen auf die vermessene Zottenfläche (%):

unter Provokation: 2.88 (± 0.27) %
unter Diät: 5.90 (± 0.28) %

Signifikanz (t-Test): $p < 0.05$

Beurteilung:

- ausgewertet wurden ≥ 3200 histomorphologisch intakte Enterozyten pro Biopsie.
- unter Diät ist die VIP-Rezeptorendichte um 105 % höher als die Rezeptorendichte unter Provokation.
- der Anstieg der VIP-Rezeptorendichte unter Diät ist signifikant.

Abb. 36 stellt die VIP-Rezeptorendichte unter Provokation und unter Diät dar.

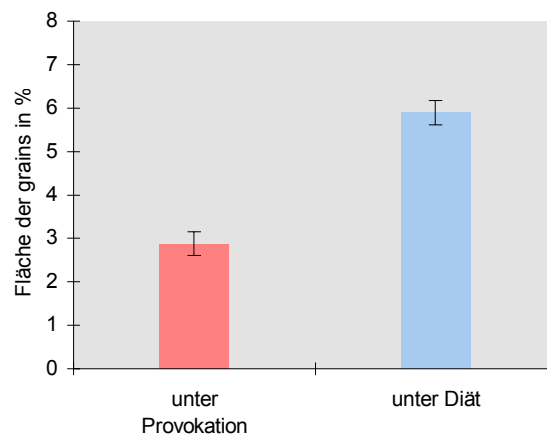


Abb. 36: VIP-Rezeptorendichte, Patient 3

Patient 4, H.E.:

- Alter zum Zeitpunkt der Biopsien: 15 Jahre
- Geschlecht: weiblich
- 1. Biopsie: unter Diät
- 2. Biopsie: unter Provokation

Provozierendes Nahrungsmittel, das durch ein als nicht provozierend getestetes Nahrungsmittel hinsichtlich des Energiegehalts, der Verteilung von Protein, Kohlenhydrat, Fett, der Osmolarität und des Volumens ersetzt werden konnte:
Kuhmilch

Ersatz des provozierenden Nahrungsmittels durch:
Ziegenmilch, die bei dieser Patientin als nicht provozierend getestet wurde.

Fläche der grains bezogen auf die vermessene Zottenfläche (%):

unter Diät: 5.40 (± 0.36) %
unter Provokation: 3.42 (± 0.8) %

Signifikanz (t-Test): $p < 0.05$

Beurteilung:

- ausgewertet wurden ≥ 3200 histomorphologisch intakte Enterozyten pro Biopsie.
- unter Diät war die VIP-Rezeptorendichte um 57.9 % höher als die Rezeptorendichte unter Provokation.
- der Abfall der VIP-Rezeptorendichte unter Provokation ist signifikant.

Abb. 37 stellt die VIP-Rezeptorendichte unter Provokation und unter Diät dar.

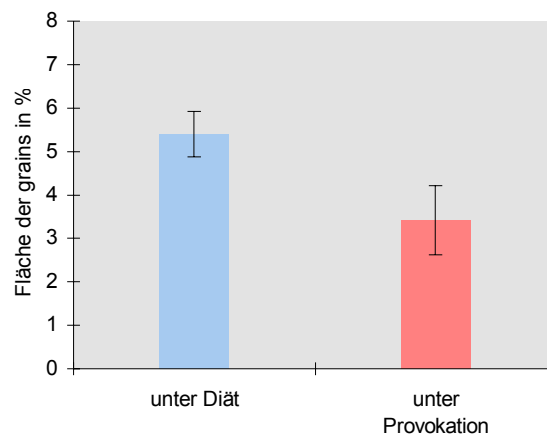


Abb. 37: VIP-Rezeptorendichte, Patient 4

Patient 5, B.R.:

- Alter zum Zeitpunkt der Biopsien: 11 Jahre
- Geschlecht: männlich
- 1. Biopsie: unter Diät
- 2. Biopsie: unter Provokation

Provozierende Nahrungsmittel, die durch ein als nicht provozierend getestetes Nahrungsmittel hinsichtlich des Energiegehalts, der Verteilung von Protein, Kohlenhydrat, Fett, der Osmolarität und des Volumens ersetzt werden konnten:
Roggen, Weizen, Kuhmilch

Ersatz der provozierenden Nahrungsmittel durch:

Hafer und Ziegenmilch, die bei diesem Patienten als nicht provozierend getestet wurden.

Fläche der grains bezogen auf die vermessene Zottenfläche (%):

unter Diät: 5.52 (\pm 0.52) %
unter Provokation: 3.67 (\pm 0.27) %

Signifikanz (t-Test): $p < 0.05$

Beurteilung:

- ausgewertet wurden ≥ 3200 histomorphologisch intakte Enterozyten pro Biopsie.
- unter Diät war die VIP-Rezeptorendichte um 50.4 % höher als die Rezeptorendichte unter Provokation.
- der Abfall der VIP-Rezeptorendichte unter Provokation ist signifikant.

Abb. 38 stellt die VIP-Rezeptorendichte unter Provokation und unter Diät dar.

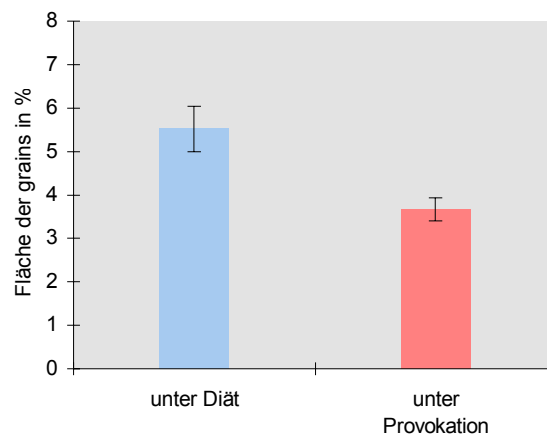


Abb. 38: VIP-Rezeptorendichte, Patient 5

Patient 6, F.T.:

- Alter zum Zeitpunkt der Biopsien: 8 Jahre
- Geschlecht: männlich
- 1. Biopsie: unter Diät
- 2. Biopsie: unter Provokation

Provozierendes Nahrungsmittel, das durch ein als nicht provozierend getestetes Nahrungsmittel hinsichtlich des Energiegehalts, der Verteilung von Protein, Kohlenhydrat, Fett, der Osmolarität und des Volumens ersetzt werden konnte:
Kuhmilch

Ersatz des provozierenden Nahrungsmittels durch:
Ziegenmilch, die bei diesem Patienten als nicht provozierend getestet wurde.

Fläche der grains bezogen auf die vermessene Zottenfläche (%):

unter Diät: 4.62 (± 0.55) %
unter Provokation: 3.66 (± 0.23) %

Signifikanz (t-Test): $p > 0.05$

Beurteilung:

- ausgewertet wurden ≥ 3200 histomorphologisch intakte Enterozyten pro Biopsie.
- unter Diät war die VIP-Rezeptorendichte um 26.2 % höher als die Rezeptorendichte unter Provokation.
- der Abfall der VIP-Rezeptorendichte unter Provokation ist nicht signifikant.

Abb. 39 stellt die VIP-Rezeptorendichte unter Provokation und unter Diät dar.

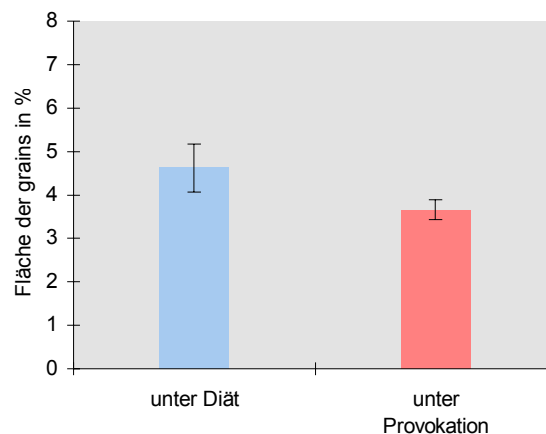


Abb. 39: VIP-Rezeptorendichte, Patient 6

Patient 7, Zi.F.:

- Alter zum Zeitpunkt der Biopsien: 7 Jahre
- Geschlecht: männlich
- 1. Biopsie: unter Provokation
- 2. Biopsie: unter Diät

Provozierendes Nahrungsmittel, das durch ein als nicht provozierend getestetes Nahrungsmittel hinsichtlich des Energiegehalts, der Verteilung von Protein, Kohlenhydrat, Fett, der Osmolarität und des Volumens ersetzt werden konnte:
Weizen

Ersatz des provozierenden Nahrungsmittels durch:
Roggen, der bei diesem Patienten als nicht provozierend getestet wurde.

Fläche der grains bezogen auf die vermessene Zottenfläche (%):

unter Provokation: 4.23 (\pm 0.59) %
unter Diät: 7.10 (\pm 0.85) %

Signifikanz (t-Test): $p < 0.05$

Beurteilung:

- ausgewertet wurden ≥ 3200 histomorphologisch intakte Enterozyten pro Biopsie.
- unter Diät ist die VIP-Rezeptorendichte um 67.8 % höher als die Rezeptorendichte unter Provokation.
- der Anstieg der VIP-Rezeptorendichte unter Diät ist signifikant.

Abb. 40 stellt die VIP-Rezeptorendichte unter Provokation und unter Diät dar.

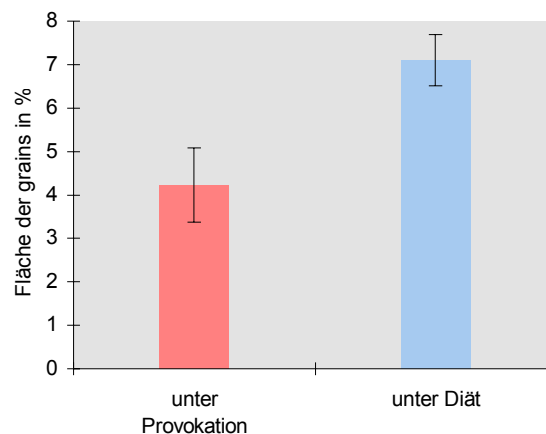


Abb. 40: VIP-Rezeptorendichte, Patient 7

Patient 8, G.P.:

- Alter zum Zeitpunkt der Biopsien: 10 Jahre
- Geschlecht: männlich
- 1. Biopsie: unter Diät
- 2. Biopsie: unter Provokation

Provozierendes Nahrungsmittel, das durch ein als nicht provozierend getestetes Nahrungsmittel hinsichtlich des Energiegehalts, der Verteilung von Protein, Kohlenhydrat, Fett, der Osmolarität und des Volumens ersetzt werden konnte:
Kuhmilch

Ersatz des provozierenden Nahrungsmittels durch:
Ziegenmilch, die bei diesem Patienten als nicht provozierend getestet wurde.

Fläche der grains bezogen auf die vermessene Zottenfläche (%):

unter Diät: 4.28 (± 0.63) %
unter Provokation: 4.40 (± 0.67) %

Signifikanz (t-Test): $p > 0.05$

Beurteilung:

- ausgewertet wurden ≥ 3200 histomorphologisch intakte Enterozyten pro Biopsie.
- unter Diät war die VIP-Rezeptorendichte um 2.7 % niedriger als die Rezeptorendichte unter Provokation.
- der Anstieg der VIP-Rezeptorendichte unter Provokation ist nicht signifikant.

Abb. 41 stellt die VIP-Rezeptorendichte unter Provokation und unter Diät dar.

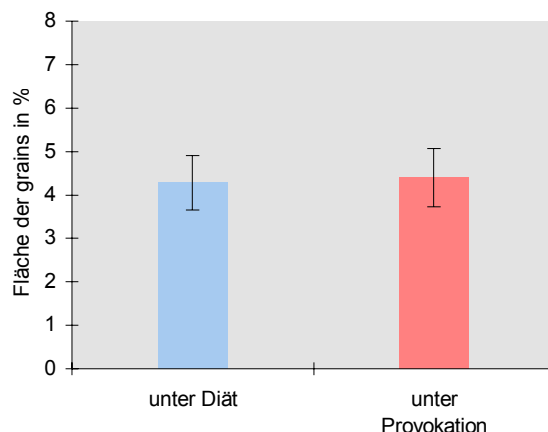


Abb. 41: VIP-Rezeptorendichte, Patient 8

Patient 9, Z.H.:

- Alter zum Zeitpunkt der Biopsien: 11 Jahre
- Geschlecht: männlich
- 1. Biopsie: unter Provokation
- 2. Biopsie: unter Diät

Provozierendes Nahrungsmittel, das durch ein als nicht provozierend getestetes Nahrungsmittel hinsichtlich des Energiegehalts, der Verteilung von Protein, Kohlenhydrat, Fett, der Osmolarität und des Volumens ersetzt werden konnte:
Kuhmilch

Ersatz des provozierenden Nahrungsmittels durch:
Ziegenmilch, die bei diesem Patienten als nicht provozierend getestet wurde.

Fläche der grains bezogen auf die vermessene Zottenfläche (%):

unter Provokation: 3.69 (± 0.5) %
unter Diät: 3.73 (± 0.5) %

Signifikanz (t-Test): $p > 0.05$

Beurteilung:

- ausgewertet wurden ≥ 3200 histomorphologisch intakte Enterozyten pro Biopsie.
- unter Diät ist die VIP-Rezeptorendichte um 1.1 % höher als die Rezeptorendichte unter Provokation.
- der Anstieg der VIP-Rezeptorendichte unter Diät ist nicht signifikant.

Abb. 42 stellt die VIP-Rezeptorendichte unter Provokation und unter Diät dar.

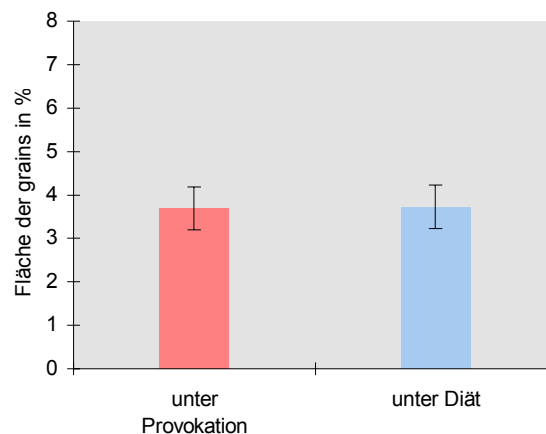


Abb. 42: VIP-Rezeptorendichte, Patient 9

Patient 10, K.F.:

- Alter zum Zeitpunkt der Biopsien: 12 Jahre
- Geschlecht: männlich
- 1. Biopsie: unter Diät
- 2. Biopsie: unter Provokation

Provozierendes Nahrungsmittel, das durch ein als nicht provozierend getestetes Nahrungsmittel hinsichtlich des Energiegehalts, der Verteilung von Protein, Kohlenhydrat, Fett, der Osmolarität und des Volumens ersetzt werden konnte:
Weizen

Ersatz des provozierenden Nahrungsmittels durch:

Roggen, der bei diesem Patienten als nicht provozierend getestet wurde.

Fläche der grains bezogen auf die vermessene Zottenfläche (%):

unter Diät: 2.7 (\pm 0.46) %
unter Provokation: 2.6 (\pm 0.34) %

Signifikanz (t-Test): $p > 0.05$

Beurteilung:

- ausgewertet wurden ≥ 3200 histomorphologisch intakte Enterozyten pro Biopsie.
- unter Diät war die VIP-Rezeptorendichte um 3.8 % höher als die Rezeptorendichte unter Provokation.
- der Abfall der VIP-Rezeptorendichte unter Provokation ist nicht signifikant.

Abb. 43 stellt die VIP-Rezeptorendichte unter Provokation und unter Diät dar.

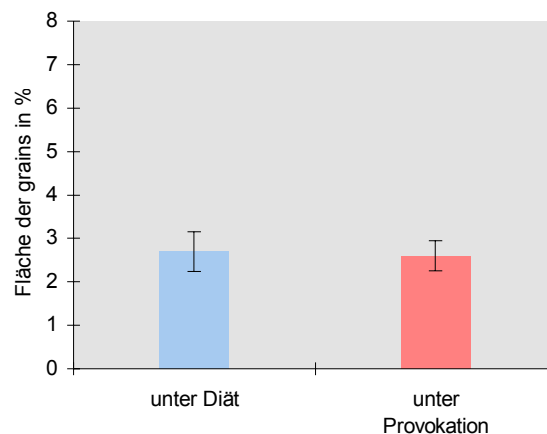


Abb. 43: VIP-Rezeptorendichte, Patient 10

D. Diskussion

Kinder mit gesichertem hyperkinetischen Syndrom können mit einer oligoantigenen Diät erfolgreich behandelt werden (Egger, 1985; Kaplan, 1989; Carter, 1993; Boris, 1994; Schulte-Korne, 1996). Die Möglichkeit eine sich vorallem neurologisch manifestierende Erkrankung über den Nahrungsweg zu therapieren und die bei den Patienten immer wieder beobachteten gastrointestinalen Symptome wie Übelkeit, Bauchschmerzen und Blähungen, machten die Untersuchung eines „brain-gut“-Hormons interessant. Wir entschieden uns daher Vasoaktives Intestinales Polypeptid als Vertreter der „brain-gut“-Hormone in der intestinalen Mukosa des Duodenums quantitativ zu untersuchen. Aufgrund der schnellen Metabolisierung von VIP selbst und der damit verbundenen Meßungenauigkeit der Serumkonzentration von VIP, wurde die Dichte der VIP-Rezeptoren bestimmt. Das Duodenum als Untersuchungsort wurde aus folgenden Gründen ausgewählt:

- Bei den Kindern mußte differentialdiagnostisch eine silente Zöliakie ausgeschlossen werden.
- Die höchste Konzentration der VIP-Rezeptoren im menschlichen Gastrointestinaltrakt findet sich im Duodenum (Zimmerman, 1989; Korman, 1989). Somit konnte vermutet werden, daß genau an diesem Ort mögliche Veränderungen in der Rezeptorendichte am ehesten entdeckt werden.

D. 1. Patientenkollektiv

Die an dieser Studie teilnehmenden Patienten wurden in der Sprechstunde „Ernährung und Verhalten“ des vom Bundesministerium für Gesundheit geförderten Modellprojektes „Ernährung und Verhalten“ im Dr. vom Haunerschen Kinderspital betreut. Die Auswahl der Patienten für diese Studie erfolgte nach einem mehrstufigen Diagnoseschema.

Zunächst mußte die Verdachtsdiagnose auf das Vorliegen einer Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) bestätigt werden. Hierzu wurden die international gültigen Diagnosekriterien des hyperkinetischen Syndroms verwendet.

Die untersuchten Patienten erfüllten die Kriterien des Diagnostischen Manuals psychischer Störungen (DSM-3R) und der International Classification of Diseases (ICD 10).

Der zweite diagnostische Schritt beinhaltete die Prüfung einer Nahrungsabhängigkeit der ADHD-Symptome. Wissenschaftliche Basis für diese weitere Eingrenzung der ADHD-Patienten waren die zahlreichen großen, randomisierten und zum Teil placebokontrollierten Studien, die eine therapeutische Beeinflussung des hyperkinetischen Syndroms durch eine oligoantigene Diät belegten (Swanson, 1980; Egger, 1985; Kaplan, 1989; Carter, 1993; Boris, 1994). Konnte unter oligoantigener Diät eine deutliche Verbesserung oder ein Verschwinden der ADHD-Symptome erreicht werden und in der Reintroduktionsphase ein oder mehrere Nahrungsmittel reproduzierbar als Auslöser bzw. Verstärker der ADHD-Symptomatik identifiziert werden, wurde die Diagnose „nahrungsmittelinduziertes hyperkinetisches Syndrom“ gestellt.

Ein weiteres Auswahlkriterium war die Indikation zu einer Dünndarmsaugbiopsie. Bei den im Modellprojekt „Ernährung und Verhalten“ betreuten Patienten mit nahrungsmittelinduziertem hyperkinetischen Syndrom wurden häufig diätabhängige Bauchschmerzen und ein geblähtes Abdomen beobachtet. Diese gastrointestinalen Beschwerden werden zunehmend als Begleitsymptome des hyperkinetischen Syndroms beobachtet (Carter, 1993). Um jedoch eine

differentialdiagnostisch zu erwägende silente Zöliakie sicher auszuschließen, wurde in Zusammenarbeit mit der gastroenterologischen Abteilung des Dr. v. Haunerschen Kinderspitals die Indikation zur Dünndarmsaugbiopsie gestellt.

Im Rahmen dieser klinisch notwendigen Untersuchungen konnte unsere wissenschaftliche Studie durchgeführt werden.

Durch die Erfüllung der oben beschriebenen Diagnosekriterien war somit sichergestellt,

- daß die an unserer Studie teilnehmenden Patienten an einem hyperkinetischen Syndrom litten;
- daß bei diesen Patienten die Symptomatik des hyperkinetischen Syndroms durch Diätmanipulation beeinflusst werden konnte;
- daß bei den Patienten eine Zöliakie sicher ausgeschlossen werden konnte (Wagner, 1998).

Die Geschlechtsverteilung der teilnehmenden Patienten zeigt ein Überwiegen des männlichen Geschlechts (8 männliche, 2 weibliche Patienten). Diese ungleiche Geschlechterverteilung steht jedoch im Einklang mit dem bekannten Überwiegen des männlichen Geschlechts bei ADHD-Patienten (Anderson, 1987; Baumgartel, 1995; Szatmari, 1992; Wang, 1993; Goldman, 1998).

D. 2. Studiendesign

Das Ziel dieser Studie war es, die Frage zu beantworten, ob bei Kindern mit nahrungsmittelinduziertem hyperkinetischen Syndrom durch Diätmanipulation die Rezeptorendichte für Vasoaktives Intestinales Polypeptid (VIP) im Duodenum beeinflusst wird.

Diese Fragestellung setzt allerdings voraus, daß die bisher vorliegenden wissenschaftlichen Belege (*Kapitel A. 1. 5. 1. und A. 1. 8. 4.*) über die therapeutische Beeinflussbarkeit des hyperkinetischen Syndroms durch Diätmanipulation akzeptiert werden. Es war daher nicht das Ziel dieser Arbeit das Phänomen der Nahrungsmittelunverträglichkeit per se auf das Verhalten hyperkinetischer Patienten zu belegen, sondern einen möglichen Wirkungsmechanismus der therapeutischen Diätmanipulation näher zu untersuchen.

Da in dieser Arbeit weltweit erstmals die VIP-Rezeptorendichte im kindlichen Duodenum untersucht wurde, standen keine Referenzwerte zur Verfügung. Diese Tatsache und das kleine Patientenkollektiv forderten einen Crossover-Versuchsplan als optimale Studienform. Durch das Crossover-Design war es möglich trotz fehlender Normwerte Aussagen über Veränderungen der VIP-Rezeptorendichte zu machen und eine interindividuelle Variabilität auszuschalten.

Der Nachteil dieser Studienform liegt im möglichen Vorhandensein von unterschiedlichen Residualeffekten (carryover-, Nacheffekte).

Durch die Varianzanalyse für Crossover-Design konnten jedoch signifikante Überhangseffekte (z. B. zu kurze „wash-out“-Phase) oder Entzugseffekte auf die Ergebnisse dieser Studie ausgeschlossen werden.

Die Zuteilung der Patienten auf den jeweiligen Studienarm erfolgte randomisiert. In dieser Studie wurde auf eine Doppelblindung verzichtet. Dies erschien uns zulässig, da nicht von einem Placeboeffekt auf die duodenale VIP-Rezeptorendichte auszugehen ist. Allerdings erfolgte die mikroautoradiographischen Auswertung der Patientenbiopsien geblindet.

D. 3. Patientencompliance

Auf eine stationäre Aufnahme während der Studienphase wurde wegen der Dauer der Untersuchungsphase und dem Ziel, die Patienten in ihrer vertrauten und natürlichen Umgebung zu belassen, verzichtet. Somit war die Kontrolle über die korrekte Einhaltung der Diät durch die ärztliche Seite eingeschränkt. Allerdings wären auch unter stationären Bedingungen Diätfehler nicht sicher auszuschließen gewesen.

Setzt man jedoch eine gute Compliance der Eltern voraus, dürfte die Kontrolle der Diäteinhaltung im engen familiären Kontakt der stationären Kontrollmöglichkeiten sogar überlegen sein. Folgende Tatsachen führten zur Annahme einer guten Compliance:

- Aufgrund der deutlichen Symptomverbesserung unter der Diät und dem hohen Leidensdruck bei Symptomausprägung, war den betroffenen Eltern der therapeutische Nutzen der Diät sehr bewußt.
- Bereits in der Testphase fand eine ausführliche Diätschulung der Eltern statt. Die Eltern zeigten vor Studienbeginn einen sicheren Umgang mit der Diät.
- Während der Studiendurchführung bestand ein enger telephonischer Kontakt zwischen dem betreuenden Team (Arzt, Diätassistentin) und den Eltern der Patienten. Es zeigte sich bei den teilnehmenden Eltern ein starker Wille und große Konzentration auf eine regelrechte Durchführung der Diät.
- Die Dauer der streng bilanzierten Diät war mit insgesamt 8 Tagen kurz. Während dieser Studienphase wurden keine Diätfehler berichtet.
- Die Auswaschphasen mit je zweimal 21 Tagen forderten keine streng bilanzierte Diät, sondern nur das Vermeiden der provozierenden Nahrungsmittel.
- Die während der Studienphasen durchgeführten Verhaltensbeurteilungen durch die Eltern, Kindergärtnerinnen und Lehrer stimmten sowohl in der Diätphase wie auch in der Provokationsphase überein.
- Immer wieder waren wir überrascht wie gewissenhaft die Patienten selbst auf eine korrekte Einhaltung der Diät bedacht waren, da ihnen der Gesundheitsgewinn unter Diät ein deutlich problemloseres Leben ermöglichte.

D. 4. Autoradiographische Methode

Bei der in unserer Studie angewandten Methode der Autoradiographie zur Bestimmung der duodenalen VIP-Rezeptorendichte handelt es sich um eine etablierte Labormethode (Young, 1979; De Souza, 1985; Mantyh, 1988; Martin, 1987; Zimmerman, 1989; Reubi, 1999). Wir entschieden uns für die autoradiographische Methode, da die Autoradiographie den Vorteil bietet, sowohl die anatomische Lokalisation als auch die quantitative Dichte von Rezeptoren zu bestimmen.

In der internationalen Fachliteratur finden sich bisher nur wenige Arbeiten über die quantitative VIP-Rezeptorenbestimmung im gesunden humanen Duodenalgewebe (King, 1989; Korman, 1989; Zimmerman, 1989). In keiner Arbeit wurden bisher VIP-Rezeptoren im kindlichen Duodenum untersucht.

Ein gravierender Unterschied zwischen unserer Studie und den bisher veröffentlichten duodenalen VIP-Rezeptorstudien bestand im Größenunterschied des zu untersuchenden Materials. Während in den bekannten Studien große Biopsate aus Tumorsektionsgebieten zur Verfügung standen, wurden für unsere Untersuchung Biopsate aus Dünndarmsaugbiopsien verwendet. Um ein artefaktfreies Durchführen der Autoradiographie auch in sehr geringen Gewebemengen sicherzustellen, wurden von uns zahlreiche

Vorversuche zur Qualitätssicherung der verwendeten Methode durchgeführt. Wie im *Kapitel C. 2.* beschrieben, konnte nachgewiesen werden, daß auch in kleinen Biopsatmengen die Autoradiographie als sichere Meßmethode zur quantitativen Bestimmung von Rezeptoren verwendet werden kann.

D. 5. VIP-Rezeptorendichte im Duodenum der Patienten mit nahrungsmittelinduziertem hyperkinetischen Syndrom

In der vorliegenden Studie wurde die VIP-Rezeptorendichte im Duodenum von 10 Kindern mit gesichertem nahrungsmittelinduziertem hyperkinetischen Syndrom unter Diät und unter Provokation untersucht.

Bei 6 Kindern wurde ein signifikanter ($p < 0.05$) Unterschied der duodenalen VIP-Rezeptorendichte zwischen den beiden verschiedenen Ernährungsformen nachgewiesen, indem sich unter Diät eine deutlich höhere VIP-Rezeptorendichte fand. Drei weitere Patienten zeigten ebenfalls unter Diät eine höhere Rezeptorendichte, allerdings war die Differenz zwischen Diät und Provokation nicht signifikant.

Nur bei einem Patienten wurde ein geringer, nicht signifikanter Abfall der VIP-Rezeptorendichte unter Diät nachgewiesen.

Da in jedem autoradiographischen Versuchsdurchgang gleichzeitig die Biopsien unter Diät und unter Provokation und damit unter identischen Bedingungen untersucht wurden als auch das präanalytische Vorgehen bei allen Patienten gleich war, scheint ein systematischer Fehler ausgeschlossen.

Wie bereits zuvor hingewiesen, existieren keinerlei Normwerte über die kindliche duodenale VIP-Rezeptorendichte, vielmehr wurden in dieser Studie weltweit erstmals VIP-Rezeptoren im kindlichen Duodenum untersucht.

Aufgrund des auch deshalb gewählten Crossover-Designs ist somit nur die Aussage zulässig, daß durch Diätmanipulation bei den untersuchten Patienten eine signifikante Veränderung der VIP-Rezeptorendichte stattfindet. Ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Rezeptorendichteveränderung und bestimmten Nahrungsmitteln konnte nicht gefunden werden. Die in unserem Patientenkollektiv als „provozierend“ identifizierten Nahrungsmittel stimmen mit den bisher durchgeführten kontrollierten Studien über die diätetische Beeinflussbarkeit des hyperkinetischen Syndroms überein.

Unklar ist, ob die provozierende Nahrung zu einer pathologischen, z. B. krankheitsauslösenden Verminderung der VIP-Rezeptoren führt und durch die Diät eine therapeutische Anhebung der VIP-Rezeptorendichte in den physiologischen Normbereich erreicht wird.

Umgekehrt wäre auch folgendes Denkmodell möglich: Die VIP-Rezeptoren liegen unter Provokation im physiologischen Normbereich, durch die oligoantigene Diät kommt es zu einem unphysiologischen Anstieg der VIP-Rezeptoren, der eine therapeutische Wirkung entfaltet.

Mehrere Gründe lassen uns jedoch die Vermutung favorisieren, daß provozierende Nahrung eine pathologische Verminderung der duodenalen VIP-Rezeptoren verursacht:

- Die Patienten zeigen unter Provokation ein pathologisches Verhalten.
- Unter provozierender Nahrung klagen die Patienten gehäuft über Bauchschmerzen.
- Unter Diät kommt es zu einem Verschwinden der Symptome und ein „physiologischer Normbereich“ des Verhaltens und begleitender Symptome wird erreicht.

Aufgrund der histologischen Untersuchungen ist eine, zumindest mikroskopisch erkennbare Schädigung des Schleimhautepithels, die zu einer primären Verminderung der VIP-Rezeptorendichte führen könnte, unwahrscheinlich. Zudem konnten wir kein vermehrtes Auftreten von entzündungsassoziierten Zellen in den Saugbiopsaten erkennen.

Somit muß eine gesteuerte Down- bzw. Upregulation der Rezeptoren in Betracht gezogen werden. Neben VIP sind bisher mehrere physiologische Substanzen bekannt, die die VIP-Rezeptorexpression beeinflussen z. B. Cortisol, Cholezystokinin (Diaz-Juarez, 1994; Wiik, 1991; Katsushima, 1990).

Der Mechanismus, über den Nahrungsmittel zu einer Dysregulation der VIP-Rezeptorexpression führen, ist bisher nicht untersucht worden. Allerdings existieren mehrere Arbeiten, die einen Einfluß verschiedener Nahrungszusammensetzungen auf die VIP-Plasmakonzentrationen nachweisen konnten (Corring, 1986; Ye, 1995; Pedersen-Bjergaard, 1996).

Möglicherweise liegen bei unseren Patienten veränderte VIP-Serumkonzentrationen vor. Erhöhte VIP-Serumkonzentrationen könnten die beobachteten gastrointestinalen Beschwerden der Patienten erklären und zu einer Suppression der VIP-Rezeptorenexpression führen. Diese Vermutung wird durch eine bisher unveröffentlichte Pilotstudie, die in der Kinderklinik an der Great Ormond Street London, durchgeführt wurde, unterstützt: Bei Kindern mit nahrungsmittelinduziertem hyperkinetischen Syndrom konnten reproduzierbar unter Provokation höhere VIP-Plasmakonzentrationen als unter Diät gemessen werden (Egger, 1997).

Der Zusammenhang unserer Ergebnisse mit der immer wieder aufgestellten Hypothese der Nahrungsmittelallergie als Erklärung für die Beeinflussbarkeit des hyperkinetischen Syndroms durch Nahrungsmittel ist bisher nicht geklärt. Es muß jedoch betont werden, daß die Bezeichnung „Nahrungsmittelallergie“ im strengen Sinne als Ursache des hyperkinetischen Syndroms wissenschaftlich wenig haltbar ist.

Neuere Arbeiten konnten eine IgE-vermittelte Immunantwort bei Kindern mit hyperkinetischem Syndrom nicht nachweisen (McGee, 1993; Blank, 1994; Gaitens, 1998). Vielmehr muß von einer Nahrungsmittelunverträglichkeit ausgegangen werden, deren pathophysiologischer Mechanismus nicht IgE-vermittelt ist. Darunter versteht man eine reproduzierbare physische oder psychische Reaktion auf Nahrungsmittel, die auch dann auftritt, wenn die Einnahme des verdächtigten Nahrungsmittels oder Nahrungsmittelzusatzes unbewußt erfolgt (Ferguson, 1992). Bei der Nahrungsmittelunverträglichkeit muß zwischen der Idiosynkrasie (Mediatorfreisetzung, Enzymmangel) und der toxischen Wirkung bestimmter Nahrungsmittel bzw. der Pseudoallergie unterschieden werden. Mehrere, nicht Antikörper vermittelte Mechanismen scheinen bei der Pseudoallergie für die gastrointestinalen Symptome verantwortlich zu sein. So wird eine direkte Wirkung der Nahrungsmittelantigene auf die Mastzellen vermutet. Zudem scheinen Nahrungsmittelantigene die Faktoren C_{3A} und C_{5A} aus dem Komplementsystem direkt zu aktivieren (Moneret-Vautrin, 1979). Allerdings gelang es erst in den letzten Jahren eine IgE-unabhängige Mastzellaktivierung durch IgG-Rezeptoren und NO im Gastrointestinaltrakt nachzuweisen (Miyajima, 1997; Iikura, 1998). In dem sich zunehmend weiterspannenden immunologischen Netzwerk des Gastrointestinaltraktes konnte vor kurzem eine Interaktion zwischen gastrointestinalem Nervensystem und Mastzellen entdeckt werden, indem eine Aktivierung der Mastzellen durch das „gut-hormone“ Substanz P nachgewiesen wurde (Bischoff, 2000).

Eine Interaktion zwischen VIP und Mastzellen wurde zwar noch nicht im Zusammenhang mit Nahrungsmittelunverträglichkeiten untersucht, jedoch scheint VIP einen hemmenden Einfluß auf die Mastzelldegeneration zu haben (Tuncel, 1998; Tuncel, 2000).

Aufgrund der in den letzten Jahren gewonnenen Erkenntnisse über die Antikörper-unabhängigen Nahrungsmittelunverträglichkeiten und unseren Studienergebnissen muß VIP als Baustein des pathophysiologischen Geschehens beim nahrungsmittelinduziertem hyperkinetischen Syndrom in Betracht gezogen werden.

Die immer wieder geäußerten, wissenschaftlich jedoch klar widerlegbaren Zweifel an der Wirksamkeit der oligoantigenen Diät beruhen teilweise auf dem bis heute ungeklärten Wirkmechanismus. Wie ist es möglich durch Diätmanipulation eine neuromodulatorische Wirkung im Zentralen Nervensystem zu erzielen?

Zunehmend erkannte man vor allem in den letzten Jahren die Komplexität der neuronalen Kommunikation zwischen Gastrointestinaltrakt und dem Zentralen Nervensystem. Die sogenannte „brain-gut“-Achse besteht aus einer multifunktionalen und bidirektionalen Informationsweiterleitung und Informationsverarbeitung zwischen ZNS und Gastrointestinaltrakt. Das neuronale Netzwerk des Gastrointestinaltraktes scheint als eine Art Microprozessor lokale Afferenzen und Efferenzen weit unabhängiger zu verarbeiten als bisher angenommen. Vagale afferente Fasern leiten Informationen dieses „abdominellen Mikroprozessors“ über den Nucleus Tractus solitarius an übergeordnete Hirnregionen. Für die synaptischen Übertragungen dieses komplexen Informationssystems sind bis heute mehr als 30 Neurotransmitter bekannt. (Wood, 1999; Aziz, 1998). Störungen in der „brain-gut“-Achse werden zum Beispiel beim Krankheitsbild des irritablen Colons vermutet. So finden sich bei diesen Patienten eine sich von Gesunden unterscheidende kortikale Aktivierung auf enterale Schmerzreize (Mertz, 2000; Wood, 1999; Aziz, 1998) und EEG-Auffälligkeiten (Nomura, 1999).

Bei Kindern mit ADHD kann durch Diätmanipulation über den Gastrointestinaltrakt eine primär kortikal generierte Verhaltensdysfunktion beeinflusst werden. Zudem konnten spezifische elektrophysiologische Wirkungen der oligoantigenen Diät im ZNS nachgewiesen werden. Uhlig (1992) zeigte bei Kindern mit nahrungsmittelinduziertem hyperkinetischen Syndrom im EEG unter Diät eine signifikante Abnahme der β_1 -Aktivität frontotemporal. In einer Studie von Kiefer (1997) wurde unter oligoantigener Diät eine signifikante Zunahme des REM-Schlafes beobachtet.

Wir stellten uns daher die Frage, ob bei Kindern mit nahrungsmittelinduziertem hyperkinetischen Syndrom eine Störung der „brain-gut“-Achse vorliegen könnte.

Hierzu konzentrierten wir uns auf die Untersuchung eines Neurotransmitters der „brain-gut“-Achse, das Vasoaktive Intestinale Polypeptid.

Die physiologischen Wirkungen von VIP, insbesondere die starke vasoaktive Potenz im präfrontalen Kortex, und die bisher vorliegenden Erkenntnisse eines veränderten Glucosemetabolismus und einer verminderten Durchblutung des präfrontalen Kortex bei Kindern mit ADHD (*Kapitel A. 1. 6. 3.*) legten die Untersuchung dieses „brain-gut“-Neurotransmitters besonders nahe.

Die in dieser Studie nachgewiesenen Veränderungen in der Dichte von duodenalen VIP-Rezeptoren unter Diät und Provokation müssen als erster Hinweis auf eine mögliche Störung der „brain-gut“-Achse bei Kindern mit nahrungsmittelinduziertem hyperkinetischen Syndrom gewertet werden.

Da wir, durch die aufwendige Studiendurchführung bedingt, nur eine kleine Patientenzahl untersuchen konnten, müssen unsere Ergebnisse zunächst in einem größeren Patientenkollektiv bestätigt werden. Zudem sind Untersuchungen wünschenswert, die

Normwerte der VIP-Rezeptordichte im Duodenum gesunder Kinder zu erstellen. Die Ergebnisse einer solchen Vergleichsgruppe würden die Frage beantworten, ob die von uns unter Provokation gefundene VIP-Rezeptorendichteminderung durch die oligoantigene Diät in den physiologischen Normbereich „up-reguliert“ wird oder erst durch Anhebung der VIP-Rezeptorendichte in den „über-physiologischen“ Bereich die therapeutische Wirkung der oligoantigenen Diät erreicht werden kann.

Erst das in den nächsten Jahren zu erwartende zunehmende Verständnis der „brain-gut“-Achse wird eine genauere Einordnung unserer Ergebnisse in den pathophysiologischen Mechanismus des nahrungsmittelinduzierten hyperkinetischen Syndroms ermöglichen.

E. Zusammenfassung

Das hyperkinetische Syndrom ist mit einer Prävalenz von 3 bis 6 Prozent die im Kinder- und Jugendalter am häufigsten auftretende psychiatrische Erkrankung. Leitsymptome des hyperkinetischen Syndroms sind Hyperaktivität, Aufmerksamkeitsstörung und Impulsivität. Die Ursachen des hyperkinetischen Syndroms sind bis heute weitgehend ungeklärt, allerdings scheinen genetische Disposition und Störungen im dopaminergen Stoffwechsel des ZNS eine Rolle zu spielen.

Als Therapie steht die Anwendung von Psychostimulantien zur Verfügung. Neben dieser medikamentösen Therapieform, konnte jedoch in den letzten 15 Jahren die oligoantigene Diät als effektive und durch zahlreiche Doppelblindstudien gesicherte Therapieform für einen Teil der betroffenen Kinder etabliert werden. Der Wirkungsmechanismus der oligoantigenen Diät ist bis heute unbekannt. Die Möglichkeit durch Diätmanipulation eine neuromodulatorische Wirkung zu erzielen, das gehäufte Auftreten von Bauchschmerzen und Studien, die Veränderungen im Glucosemetabolismus und der Durchblutung des präfrontalen Cortex nachweisen konnten, lassen eine Störung in der „brain-gut“-Achse möglich erscheinen.

Wir untersuchten bei 10 Kindern mit nahrungsmittelinduziertem hyperkinetischen Syndrom die Rezeptordichte in duodenalen Enterozyten für Vasoaktives Intestinales Polypeptid (VIP), ein Neurotransmitter der „brain-gut“-Achse.

Alle Patienten erfüllten die diagnostischen Kriterien des DSM IIIR und des ICD 10 für das hyperkinetische Syndrom. Zudem bestanden bei allen untersuchten Patienten rezidivierende Bauchschmerzen. Die Patienten zeigten unter einer oligoantigenen Diät ein Verschwinden oder einen deutlichen Rückgang der Symptome des hyperkinetischen Syndroms und der Bauchschmerzen. Reproduzierbar konnten diese Symptome durch Zufuhr bestimmter Nahrungsmittel (provokierende Nahrung) wieder hervorgerufen werden.

Randomisiert wurden die Patienten auf zwei Studienarme verteilt. Nach einer standardisierten, dreiwöchigen „wash-out“-Phase wurden Dünndarmsaugbiopsien aus der Flexura dodojejunalis bei jedem Patienten sowohl unter Diät als auch unter Provokation durchgeführt.

Die Dünndarmsaugbiopsate wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt. Die Bestimmung der duodenalen VIP-Rezeptordichte erfolgte durch Autoradiographie mit ¹²⁵J-VIP. Zur Quantifizierung wurde die Methode der Mikroautoradiographie angewandt. Pro Patient wurden je 3200 Enterozyten unter Diät und unter Provokation untersucht.

9 Patienten (n=10) zeigten unter Diät eine höhere VIP-Rezeptordichte als unter Provokation. Bei 6 Patienten war die Differenz in der VIP-Rezeptordichte signifikant ($p < 0.05$). Ein Patient wies unter Provokation eine gering höhere VIP-Rezeptordichte als unter Diät auf, allerdings war der Anstieg der VIP-Rezeptordichte unter Provokation nicht signifikant. In der Varianzanalyse für Crossover-Design konnte ein Überhangeffekt ausgeschlossen werden. Die deswegen zulässige Poolung beider Studienarme ergab einen hochsignifikanten Unterschied der VIP-Rezeptordichte unter Diät und Provokation ($p = 0.0038$).

In unserer Crossover-Studie konnte gezeigt werden, daß durch Diätmanipulation die VIP-Rezeptordichte im Dünndarm bei Kindern mit nahrungsmittelinduziertem hyperkinetischen Syndrom beeinflusst wird.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß VIP im Pathomechanismus des nahrungsmittelinduzierten hyperkinetischen Syndroms eine Rolle spielt.

F. Literaturverzeichnis

1. Adamou J, Aiyar N, van Horn S, Elshourbagy N: Cloning and functional characterization of the human vasoactive intestinal peptide (VIP)-2 receptor. *Biochemical Biophysiological Research Communication* 1995; 209: 385-392.
2. Ahren B, Alumets J, Ericsson M, Fahrenkrug J, Fahrenkrug L, Hakanson R, Hedner P, Loren I, Melander A, Rerup C, Sundler F: VIP occurs in intrathyroidal nerves and stimulates thyroid hormone secretion. *Nature* 1980; 287(5780): 343-345.
3. Allescher HD, Kurjak M, Huber A, Trudrung P, Schusdziarra V: Regulation of VIP release from rat enteric nerve terminals: Evidence for a stimulatory effect of NO. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal-and-Liver-Physiology* 1996; 34 (4): 568-574.
4. Altieri R, Diamond L: Relaxant effects of vasoactive intestinal peptide and bethanechol in cat intrapulmonary artery. *European Journal of Pharmacology* 1983; 93(1-2): 121-124.
5. American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Washington DC, American Psychiatric Association 1994; (4th edition): 74-85.
6. Anderson JC, Williams S, McGee R, Silva PA: DSM-III-R disorders in preadolescent children: Prevalence in a large sample from the general population. *Archives of General Psychiatry* 1987; 44: 69-76.
7. Arimura A, Said SI: VIP, PACAP, and related peptides. Second International Symposium. New York: Annals of The New York Academy of Science 1996: 1-792.
8. Aronson M, Hagberg B, Gillberg C: Attention deficits and autistic spectrum problems in children exposed to alcohol during gestation: a follow-up study. *Developmental Medicine and Child Neurology* 2000; 39(9): 583-587.
9. August GJ, Holmes CS: A six-year follow-up of behavior and academic achievement in hyperactive subgroups and learning-disabled boys. *American Journal of Diseases in Childhood* 1984; 138: 1025.
10. Aylward EH, Reiss AL, Reader MJ, Singer HS, Brown JE, Denckla MB: Basal ganglia volumes in children with Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. *Journal of Child Neurology* 1996; 11: 112-115.
11. Aziz Q, Thompson DG: Brain-Gut Axis in Health and Diseases. *Gastroenterology* 1998; 114: 559-578.
12. Baird AA, Muir TC: Membrane hyperpolarization, cyclic nucleotide levels and relaxation in the guinea-pig internal anal sphincter. *British Journal of Pharmacology* 1990; 100(2): 329-335.

13. Balsa JA, Cacicedo L, Lara JJ, Lorenzo MJ, Pazos F, Sanchez-Franco F: Autocrine and/or paracrine action of vasoactive intestinal peptide on thyrotropin-releasing hormone-induced prolactin release. *Endocrinology* 1996; 137(1): 144-150.
14. Barajas L, Sokolski D, Lechago J: Vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive nerves in the kidney. *Neuroscience Letters* 1983; 43: 263-269.
15. Barkley RA, Cunningham ChE: Do stimulant drugs improve the academic performance of hyperkinetic children? *Clinical Pediatrics* 1978; 17: 85-91.
16. Barkley RA, Cunningham, ChE: Do stimulant drugs improve the academic performance of hyperkinetic children? *Clinical Pediatrics* 1978; 17: 85-91.
17. Barkley RA: Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Child psychopathology*, New York 2000: 63-112.
18. Barkley RA: Behavioral inhibition, sustained attention, and executive functions: Constructing a unifying theory of ADHD. *Psychological Bulletin* 2000; 121: 65-94.
19. Barkley RA: Behavioral inhibition, sustained attention, and executive functions: constructing a unifying theory of ADHD. *Psychological Bulletin* 1997; 121(1): 65-94.
20. Baumgardner TL, Singer HS, Denckla MB, Rubin MA, Abrams MT, Colli MJ, Reiss AL: Corpus callosum morphology in children with Tourette's syndrome and attention deficit hyperactivity disorder. *Neurology* 1996; 4: 477-482.
21. Baumgartel A, Wolraich M, Dietrich M: Comparison of diagnostic criteria for attention deficit disorder in a German elementary school sample. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 1995; 34: 629-638.
22. Beck N, Warnke A, Kruger H, Barglik W: Hyperkinetisches Syndrom und Auffälligkeiten im Strassenverkehr: Eine fallkontrollierte Pilotstudie. *Zeitschrift für Kinder und Jugendpsychiatrie und Psychotherapie* 1996; 24(2): 82-91.
23. Bernard C: Memoir on The Pancreas. Translated by John Hederson. Monographs of the Society, Academic Press London 1985; 42.
24. Berry C, Shaywitz S, Shaywitz B: Girls with attention deficit disorders: A silent minority? A report on behavioral and cognitive characteristics. *Pediatrics* 1985; 76(5): 801-809.
25. Bevan J, Moscovitz M, Said S, Bugaß G: Evidence that vasoactive intestinal polypeptide is a dilator transmitter to some cerebral and extracerebral cranial arteries. *Peptides* 1984; 5: 385-388.
26. Biancani P, Walsh J, Behar J: Vasoactive intestinal polypeptide: A neurotransmitter for lower esophageal sphincter relaxation. *Journal of Clinical Investigation* 1984; 73: 963-967.

27. Biber B, Lundgren O, Svanvik J: Studies on the intestinal vasodilatation observed after mechanical stimulation of the mucosa of the gut. *Acta Physiologica Scandinavica* 1971; 82: 177-190.
28. Bidder RT, Gray OP, Newcombe R: Behavioural treatment of hyperactive children. *Archives of Diseases in Childhood* 1978; 53(7): 574-579.
29. Biederman J, Baldessarini RJ, Wright V, Knee D, Harmatz JS, Goldblatt AA: double-blind placebo controlled study of desipramine in the treatment of ADD: II: Serum drug levels and cardiovascular findings. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 1989; 28: 903-911.
30. Biederman J, Milberger S, Faraone S, Kiely K, Guite J, Mick E, Ablon J, Warburton R, Reed E, Davis S: Impact of adversity on functioning and comorbidity in children with attention-deficit hyperactivity disorder. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 2000; 34(11): 1495-1503.
31. Biederman J, Thisted RA, Greenhill LL, Ryan ND: Estimation of the association between desipramine and the risk of sudden death in 5 to 14-year-old children. *Journal of Clinical Psychiatry* 1995; 56: 87-93.
32. Biedermann J, Munir K, Knee D, Habelow W, Armentano M, Autor S, Hoge SK, Waternaux C: A family study of patients with attention deficit disorder and normal controls. *Journal of Psychiatric Research* 1986; 20: 263-274.
33. Binder H, Lemp G, Gardner J: Receptors for vasoactive intestinal peptide and secretion on small intestinal epithel cells. *Ameriacn Journal of Physiology* 1980; 238: 190-196.
34. Bischoff S, Mayer J, Manns M: Allergy and the Gut. *International Archives of Allergy and Immunology* 2000; 121: 270-283.
35. Bitar K, Said S, Weir G, Saffouri B, Makhoulf G: Neural release of vasoactive intestinal peptide from the gut. *Gastroenterology* 1980; 79: 1288-1294.
36. Blank R, Remscheidt H: The role of allergy among psychological and neurological factors. *European Child and Adolescent Psychiatry* 1994; 3: 220-228.
37. Bloom S, Edwards A: Effects of autonomic stimulation on the release of vasoactive intestinal peptide from the gastrointestinal tract in the calf. *Journal of Physiology* 1980; 299: 437-452.
38. Bloom S: Vasoactive intestinal peptide, the major mediator of the WDHA (pancreatic cholera) syndrome: value of measurement in diagnosis and treatment. *American Journal of Digestive Diseases* 1978; 23: 373-376.
39. Bodanszky M, Klausner Y, Lin C, Mutt V, Said S: Synthesis of vasoactive intestinal polypeptide. *Journal of the American Chemical Society* 1974; 96: 4973-4978.
40. Boris M, Mandel FS: Food and additives are common causes of the attention deficit hyperactive disorder in children. *Annals of Allergy* 1994; 72: 462-468.

41. Borland BL, Heckman HK: Hyperactive boys and their brothers. A 25-year follow-up study. *Archives of General Psychiatry* 1976; 33(6): 669-675.
42. Bradley C: Behavior of children receiving benzedrine. *American Journal of Psychiatry* 1937; 94: 577-585.
43. Brenner A: A study of the efficacy of the Feingold diet on hyperkinetic children. *Clinical Pediatrics* 1977; 16(7):652-656.
44. Brookes S: Neuronal nitric oxide in the gut. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 1993; 8(6): 590-603.
45. Brugal S: Required facilities for image analysis at the microscope in biological and medical applications: the SAMBA image processor. in: Burger, G. (ed.): *Cytometry and Histometry*, Academic Press New York 1987: 3-17.
46. Bunnett N, Reeve J, Dimaline R, Shively J, Hawke D, Walsh J: The isolation and sequence analysis of vasoactive intestinal peptide from a ganglioneuroblastoma. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1984; 59(6):1133-1137.
47. Burleigh D, Furness J: Distribution and actions of galanin and vasoactive intestinal peptide in the human colon. *Neuropeptides* 1990; 16(2): 77-82.
48. Calam J, Dimaline R, Peart WS, Singh J, Unwin RJ: Effects of vasoactive intestinal polypeptide on renal function in man. *Journal of Physiology London* 1983; 345: 469-475.
49. Calam J, Unwin RJ, Singh J, Dorudi S, Peart WS: Renal function during vasoactive intestinal peptide (VIP) infusions in normal man and patients with liver disease. *Peptides* 1984; 5(2): 441-443.
50. Carlquist M, Mutt V, Jornvall H: Isolation and characterisation of bovine vasoactive intestinal peptide (VIP). *FEBS Letters* 1979; 108: 457-460.
51. Carretero J, Vazquez RJ, Santos M, Cacicedo L, Rubio M, Sanchez-Franco F, Vazquez R: Dopamine inhibits in vitro release of VIP and proliferation of VIP-immunoreactive pituitary cells. *Neuropeptides* 1998; 30(1): 81-86.
52. Carter C, Urbanowicz M, Hemsley R, Mantilla L, Strobel S, Graham P, Taylor E: Effects of a few food diet in attention deficit disorder. *Archives of Diseases in Childhood* 1993; 69(5): 564-568.
53. Castellanos FX, Giedd JN, Eckburg P, Marsh WI, Vaituzis A, Kaysen D, Hamburger SD, Rapoport JL: Quantitative morphology of the caudate nucleus in Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *American Journal of Psychiatry* 1994; 151: 1791-1796.
54. Castellanos FX, Giedd JN, Hamburger SD, Marsh WI, Rapoport JL: Brain morphometry in Tourette's syndrome: The influence of comorbid attention deficit/hyperactivity disorder. *Neurology* 1996; 47: 1581-1583.
55. Castellanos FX, Giedd JN, Marsh WI, Hamburger SD, Vaituzis A, Dickstein DP, Sarfame SE, Vauss YC, Ritchie GF, Rajapakse JC, Rapoport JL: Quantitative brain Magnetic

- Resonance Imaging in Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. *Archives of General Psychiatry* 1996; 53: 607-616.
56. Castellanos FX, Lau E, Tayebi N, Lee P, Long RE, Giedd JN, Sharp W, Marsh WL, Walter JM, Hamburger SD, Ginns EI, Rapoport JL, Sidransky E: Lack of an association between a dopamine-4 receptor polymorphism and attention-deficit/hyperactivity disorder: genetic and brain morphometric analyses. *Molecular Psychiatry* 1998; 3(5): 431-434.
 57. Castellanos FX, Lau E, Tayebi N, Lee P, Long RE, Giedd JN, Sharp W, Marsh WL, Walter JM, Hamburger SD, Ginns EI, Rapoport JL, Sidransky E: Lack of an association between a dopamine-4 receptor polymorphism and attention-deficit/hyperactivity disorder: genetic and brain morphometric analyses. *Molecular Psychiatry* 1998; 3(5): 431-434.
 58. Chabot RJ, Serfontein G: Quantitative electroencephalographic profiles of children with Attention Deficit Disorder. *Biological Psychiatry* 1996; 40: 951-963.
 59. Chayvialle J, Miyata M, Descos F, Rayford P, Thompson J: Physiological observations on vasoactive intestinal peptide in the digestive tract. *Vasoactive Intestinal Peptide*, Raven Press, New York 1982: 447-456.
 60. Chew LJ, Burke ZD, Morgan H, Gozes I, Murphy D, Carter DA: Transcription of the vasoactive intestinal peptide gene in response to glucocorticoids: Differential regulation of alternative transcripts is modulated by a labile protein in rat anterior pituitary. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1997; 130(1-2): 83-91.
 61. Christophe J, Svoboda M, Lambert M, Waelbroeck M, Winnd J, Dehaye J, Vandermeers-Piret M, Vandermeers A, Robberecht P: Effector mechanisms of peptides of the VIP family. *Peptides* 1986; 7: 101-107.
 62. Christophe J, Waelbroeck M, Chatelain P, Robberecht P: Heart receptors for VIP, PHI and secretin are able to activate adenylate cyclase and to mediate inotropic and chronotropic effects. Species variations and physiopathology. *Peptides* 1984; 5(2): 341-353.
 63. Conners C: Rating scales for use in drug studies with children. *Psychopharmacological Bulletin* 1973 (Special Issue-Pharmacotherapy with children): 24-48.
 64. Conners CK, Goyette CH, Southwick DA, Lees JM: Food additives and hyperkinesis: A controlled double blind experiment. *Pediatrics* 1976; 58: 154-166.
 65. Conners CK, Levin ED, Sparrow E, Hinton SC, Erhardt D, Meck WH, Rose JE, March J: Nicotine and attention in adult attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Psychopharmacological Bulletin* 1996; 32(1): 67-73.
 66. Cook EH, Stein MA, Krasowski MD, Cox NJ, Olkon DM, Kieffer J, Leventhal BL: Association of attention-deficit disorder and the dopamin transporter gene. *American Journal of Human Genetics* 1995; 56: 993-998.

67. Cook P, Woodhill J: The Feingold dietary treatment of the hyperkinetic syndrome. *Medical Journal of Australia* 2000; (90): 85-88.
68. Corring T, Gueugneau AM, Chayvialle JA: Short-term (8-day) effects of a raw soybean diet on exocrine pancreatic secretion and plasma gastrointestinal hormone levels in the pig. *Reproduction, Nutrition and Development* 1986; 26(2A): 503-514.
69. Costa M, Furness J, Llewellyn-Smith IJ: Histochemistry of the enteric nervous system. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 2, New York, Raven Press 1987: 1-40.
70. Costa M, Furness J: The origins, pathways and terminations of neurons with VIP-like immunoreactivity in the guinea-pig small intestine. *Neuroscience* 1983; 8(4): 665-676.
71. Couvineau A, Rouyer-Fessard C, Darmoul D, Moret J, Carrero I, Ogier-Denis E, Labourthe M: Cloning of a common VIP-PACAP Receptor from Human Intestine. In: Rosselin G (ed): *International Symposium on VIP, PACAP & related regulatory peptides* World Scientific 1993 Paris; 129-142.
72. Cox C, Linden J, Said S: VIP elevates platelet cyclic AMP (cAMP) levels and inhibits in vitro platelet activation induced by platelet-activating factor (PAF). *Peptides* 1984; 5(2): 325-328.
73. Crook WG, Harrison WW, Crawford SE, Emerson BS: Systemic manifestations due to allergy: Report of fifty patients and a review of the literature on the subject. *Pediatrics* 1961: 790-799.
74. Dagan Y, Zeevi Luria S, Sever Y, Hallis D, Yovel I, Sadeh A, Dolev E: Sleep quality in children with attention deficit hyperactivity disorder: An actigraphic study. *Psychiatry and Clinical Neuroscience* 1997; 51(6): 383-386.
75. Daly G, Hawi Z, Fitzgerald M, Gill M: Mapping susceptibility loci in attention deficit hyperactivity disorder: preferential transmission of parental alleles at DAT1, DBH and DRD5 to affected children. *Molecular Psychiatry* 1999; 4(2): 192-196.
76. Davis G, Santa-Ana C, Morawski S, Fordtran J: Effect of vasoactive intestinal polypeptide on active and passive transport in the human jejunum. *Journal of Clinical Investigation* 1981; 67(6): 1687-1694.
77. De Souza E, Seifert H, Kuhar M: Vasoactive intestinal peptide receptor localization in rat forebrain by autoradiography. *Neuroscience Letters* 1987; 56: 113-120.
78. Denckla MB, Bemporad JR, MacCay MC: Tics following methylphenidate administration: a report of 20 cases. *Journal of the American Medical Association* 1976; 235: 1349-1351.
79. Dey R, Shannon W, Said S: Localization of VIP-immunoreactive nerves in airways and pulmonary vessels of dogs, cats human subjects. *Cell Tissue Res.* 1981; 220: 231-238.
80. Dharmasathaphorn K, Mandel K, Masui H, McRoberts J: Vasoactive intestinal polypeptide-induced chloride secretion by a colonic epithelial cell line. *Direct*

- participation of a basolaterally localized Na⁺,K⁺,Cl⁻ cotransport system. *Journal of Clinical Investigation* 1985; 75(2): 462-471.
81. Diaz-Juarez JL, Frechilla D, Romero G, Sanchez-Franco F, Del Rio J: VIP suppression in the intestine and cerebral cortex following administration of VIP antiserum to newborn rats. *Rev Esp Fisiol* 1994; 50(2): 109-115.
 82. Dimaline R, Reeve J, Shively J, Hawke D: Isolation and characterisation of rat vasoactive intestinal peptide. *Peptides* 1984; 5: 183-187.
 83. Domschke S, Domschke W, Bloom S, Mitznegg P, Mitchell S, Lux G, Struntz U: Vasoactive intestinal peptide in man: pharmacokinetics, metabolic and circulatory effects. *Gut* 1978; 19: 1049-1053.
 84. Droese W, Stolley H, Kersting M: Energy and nutrient supply during childhood. II. Protein supply. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 1978; 126(8): 524-528.
 85. Edelbrock C, Rende R, Plomin R, Thompson LA: Twin study of competence and problem behaviour in childhood and early adolescence. *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 1995; 36: 775-785.
 86. Egger H, Costello E, Erkanli A, Angold A: Somatic complaints and psychopathology in children and adolescents: stomach aches, musculoskeletal pains, and headaches. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 1999; 38(7): 852-860.
 87. Egger J, Carter CM, Graham J, Gumley D, Soothill JF: Controlled trial of oligoantigenic treatment in the hyperkinetic syndrome. *Lancet* 1985; 9: 540-545.
 88. Egger J, Stolla A, McEwen LM: Controlled trial of hyposensitisation in children with food-induced hyperkinetic syndrome. *Lancet* 1992; 339: 1150-1153.
 89. Egger J: Persönliche Mitteilung, Dr. v. Haunersches Kinderspital, München 1997.
 90. Eklund S, Fahrenkrug J, Jodal M, Lundgren O, Schaffalitzky-de-Muckadell O, Sjoquist A: Vasoactive intestinal polypeptide, 5-hydroxytryptamine and reflex hyperaemia in the small intestine of the cat. *Journal of Physiology*. 1980; 302: 549-557.
 91. Elia J, Borcharding BG, Potter WZ, Mefford IN, Rapaport JL, Keysor CS: Stimulant drug treatment of hyperactivity: biochemical correlates. *Clinical Pharmacological Therapy* 1990; 48: 57-66.
 92. Elia J, Gulotta C, Rose SR, Marin G, Rapoport JL: Thyroid function and attention-deficit hyperactivity disorder. *Journal of American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 1994; 33(2): 169-172.
 93. Elia J, Welsh PA, Gullotta CS, Rapaport JL: Classroom academic performance: improvement with both methylphenidate and dextroamphetamine in ADHD boys. *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 1993; 34: 785-804.
 94. Ernst M, Liebenauer LL, King AC, Fitzgerald GA, Cohen RM, Zametkin AJ: Reduced brain metabolism in hyperactive girls. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 1994; 33: 858-868.

95. Fahrenkrug J, Haglund U, Jodal M, Lundgren L, Olbe L, Schaffalitzky-de-Muckadell O: Nervous release of vasoactive intestinal polypeptide in the gastrointestinal tract of cats: possible implications. *Journal of Physiology* 1978; 284: 405-422.
96. Fahrenkrug J, Schaffalitzky-de-Muckadell O: Distribution of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in the porcine central nervous system. *Journal of Neurochemistry* 1978; 31: 1445-1451.
97. Fahrenkrug J: Transmitter role of vasoactive intestinal peptide. *Pharmacology and Toxicology* 1993; 72: 354-363.
98. Faraone S, Biederman J, Chen W, Milberger S, Warburton R, Tsuang M: Genetic heterogeneity in attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD): gender, psychiatric comorbidity, and maternal ADHD. *Journal of Abnormal Psychology* 1995; 104(2): 334-345.
99. Faraone S, Biederman J, Keenan K, Tsuang MT: A family genetic study of girls with DSM-III attention deficit disorder. *American Journal of Psychiatry* 1991; 148: 112-117.
100. Faraone S, Biederman J, Lehman B, Spencer T, Norman D, Seidman L, Kraus I, Perrin J, Chen W, Tsuang M: Intellectual performance and school failure in children with attention deficit hyperactivity disorder and in their siblings. *Journal of abnormal Psychology* 1993; 102(4): 616-623.
101. Faraone S, Biederman J, Milberger S: An exploratory study of ADHD among second degree relatives of ADHD children. *Society of Biological Psychiatry* 1996; 35: 398-402.
102. Faraone SV, Biederman J, Weiffenbach B, Keith T, Chu, MP, Weaver A, Spencer TJ, Wilens TE, Frazier J, Cleves M, Sakai J: Dopamine D4 gene 7-repeat allele and attention deficit hyperactivity disorder. *American Journal of Psychiatry* 1999; 156(5): 768-770.
103. Faraone SV, Biederman J: Genetics of Attention Deficit Hyperactivity Disorder. In: L.L.Greenhill (Ed.), *Child and adolescent psychiatric clinics of North America: Disruptive disorders* 1994; 3: 285-301.
104. FDA: Summaries of "dear health professional" letters and other safety notifications. *FDA Medical Bulletin* 1997; 27(1): 6.
105. Feingold BF: Hyperkinesis and learning disabilities linked to artificial food flavors and colors. *American Journal of Nursery* 1975; 75: 797-803.
106. Ferguson A: Definitions and diagnosis of food intolerance and food allergy: Consensus and controversy. *Journal of Pediatrics* 1992; 121: 7-11.
107. Ferri G, Adrian T, Ghatei M, O'Shaughnessy D, Probert L, Lee Y, Buchan A, Polak J, Bloom S: Tissue localization and relative distribution of regulatory peptides in separated layers from the human bowel. *Gastroenterology* 1983; 84: 777-786.

108. Ferri GL, Adrian TE, Ghatei MA, O'Shaughnessy DJ, Probert L, Lee YC, Buchan AM, Polak JM, Bloom SR: Tissue localization and relative distribution of regulatory peptides in separated layers from the human bowel. *Gastroenterology* 1983; 84: 777-786.
109. Filipek PA, Richelme C, Kennedy DN, Caviness VS: The young adult human brain: an MRI-based morphometric analysis. *Cerebral Cortex* 1994; 4: 344-360.
110. Filipek PA, Semrud-Clikeman M, Steingard RJ, Renshaw PF, Kennedy DN, Biederman J: Volumetric MRI analysis comparing subjects having attention-deficit hyperactivity disorder with controls. *Neurology* 1997; 48: 589-601.
111. Finke U, Seifert J: Differential effects of gastrointestinal hormones on the blood flow of the alimentary tract of the dog. *Research in Experimental Medicine* 1986; 186: 151-165.
112. Fiscus RR, Zhou HL, Wang X, Han C, Ali S, Joyce CD, Murad-F: Calcitonin gene-related peptide (CGRP)-induced cyclic AMP, cyclic GMP and vasorelaxant responses in rat thoracic aorta are antagonized by blockers of endothelium-derived relaxant factor (EDRF). *Neuropeptides* 1991; 20: 133-143.
113. Gaitens T, Kaplan B, Freigang B: Absence of an association between IgE-mediated atopic responsiveness and ADHD symptomatology. *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 1998; 39(3): 427-431.
114. Gaitens T, Kaplan B, Freigang B: Absence of an Association between IgE-mediated Atopic Responsiveness and ADHD Symptomatology. *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 1998; 39(3): 427-431.
115. Ganz P, Sandrock W, Landis S, Leopold J, Gimbrone M, Alexander R: Vasoactive intestinal peptide: Vasodilatation and cyclic AMP generation. *American Journal of Physiology* 1986; 250: H 755-760.
116. Gespach C, Chastre E, Emami S, Mulliez N: Vasoactive intestinal peptide receptor activity in human fetal enterocytes. *FEBS-Letters* 1985; 180(2): 196-202.
117. Giedd JN, Castellanos FX, Casey BJ, Kozuch PL, King AC, Hamburger SD: Quantitative morphology of the corpus callosum in Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *American Journal of Psychiatry* 1994; 151: 665-669.
118. Giedd JN, Snell JW, Lange N, Rajapakse JC, Casey BJ, Kozuch PL, Vaituzis AC, Vauss YC, Hamburger SD, Kaysen D, Rapaport JL: Quantitative magnetic resonance imaging of human brain development: Ages: 4-18. *Cerebral Cortex* 1996; 6: 551-560.
119. Gill M, Daly G, Heron S, Hawi Z, Fitzgerald M: Confirmation of association between attention deficit hyperactivity disorder and a dopamin transporter polymorphism. *Biological Psychiatry* 1997; 2: 311-313.
120. Gillberg C, Melander H, von Knorring AL: Long-term stimulant treatment of children with attention-deficit hyperactivity disorder symptoms: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Archives of General Psychiatry* 1997: 857-864.

121. Gillis JJ, Gilger JW, Pennington BF, DeFries JC: Attention deficit disorder in reading-disabled twins: Evidence for a genetic etiology. *Journal of Abnormal Child Psychology* 1992; 20: 303-315.
122. Gittelman R, Mannuzza S, Shenker R, Bonagura N: Hyperactive boys almost grown up. I. Psychiatric status. *Archives of General Psychiatry* 1985; 42(10): 937-947. 1985.
123. Goiny M: Effects of dopaminomimetics on the secretion of VIP-like immunoreactivity in conscious dogs. *Uvnas-Moberg-K. Peptides* 1986; 7(1): 221-224.
124. Goldman LS, Genel M, Bezman RJ, Slanetz PJ: Diagnosis and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents. *Journal of the American Medical Association* 1998; 279(14): 1100-1107.
125. Gozes I, Bodner M, Shani Y, Fridkin M: Structure and expression of the vasoactive intestinal peptide (VIP) gene in a human tumor. *Peptides* 1986; Suppl 1: 1-6.
126. Gozes I: Biosynthesis and regulation of expression: the vasoactive intestinal peptide gene. *Annals of The New York Academy of Science* 1988; 527: 77-86.
127. Graf A, Hutter W, Hacker G, Steiner H, Anderson V, Staudach A, Dietze O: Localization and distribution of vasoactive neuropeptides in the human placenta. *Placenta* 1996; 17(7): 413-421.
128. Gray JA: *The neuropsychology of anxiety*. Oxford University Press, New York. 1982.
129. Greenhill LL, Halperin JM, Abikoff H: Stimulant medications. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 1999; 38(5): 503-512.
130. Grider J, Cable M, Said S, Makhoulf G: Vasoactive intestinal peptide as a neural mediator of gastric relaxation. *American Journal of Physiology* 1985; 248: 73-78.
131. Grider J, Makhoulf G: Colonic peristaltic reflex: identification of vasoactive intestinal peptide as a mediator of descending relaxation. *American Journal of Physiology* 1986; 251: 40-45.
132. Grider J: Identification of neurotransmitters regulating intestinal peristaltic reflex in humans. *Gastroenterology* 1989; 97: 1414-1419.
133. Hafer H: *Nahrungssphosphat: Die heimliche Droge. Ursache für Verhaltensstörungen, Schulversagen und Jugendkriminalität*. Kriminalistikverlag Heidelberg, 1975.
134. Hammond PJ, Talbot K, Chapman R, Ghatei MA, Bloom SR: Vasoactive intestinal peptide, but not pituitary adenylate cyclase-activating peptide, modulates the responsiveness of the gonadotroph to LHRH in man. *Journal of Endocrinology* 1993; 137(3): 529-532.
135. Hanna GL, Ornitz EM, Hariharan M: Urinary catecholamine excretion and behavioral differences in ADHD and normal boys. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology* 1996; 6(1): 63-73.

136. Harmar AJ, Arimura A, Gozes I, Journot L, Laburthe M, Pisegna JR, Rawlings SR, Robberecht P, Said SI, Sreedharan SP, Wank SA, Waschek JA: International Union of Pharmacology. XVIII. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Pharmacological Reviews* 1998; 50(2): 265-270.
137. Hauser P, Zametkin AJ, Martinez P, Vitiello B, Matochik JA, Mixson AJ, Weintraub BD: Attention deficit-hyperactivity disorder in people with generalized resistance to thyroid hormone. *New England Journal of Medicine* 1993; 328(14): 997-1001.
138. Hayakawa Y, Obata K, Itoh N, Yanaihara N, Okamoto H: Cyclic AMP regulation of pro-vasoactive intestinal polypeptide/PHM-27 synthesis in human neuroblastoma cells. *Journal of Biological Chemistry* 1984; 259: 9207-9211.
139. Hechtman L: Genetic and neurobiological aspects of attention deficit hyperactivity disorder: A review. *Journal of Psychiatric Neurosciences* 1994; 19: 193-201.
140. Heffron WA, Martin CA, Welsh RJ: Attention deficit disorder in three pairs of monozygotic twins: A case report. *Journal of the American Academy of Child Psychiatry* 1984; 23: 299-301.
141. Heigl A: Persönlicher Mitteilung, Landshut, 1991.
142. Hendrickson A, Moe L, Noble B: Staining for autoradiography of the central nervous system. *StainTechnology* 1972; 47(6): 283-290.
143. Herkenham M: Receptor autoradiography: optimizing anatomical resolution. In: *Receptor Localization: Ligand Autoradiography*, Alan R. Liss, Inc., 1988: 9-47.
144. Hoffmann H: Der Zappelphilipp. in: *Der Struwpeter oder lustige Geschichten und drollige Bilder*, Inselverlag Leipzig 1845.
145. Hudziak JJ, Todd RD: Familial subtyping of ADHD. *Current Opinions in Psychiatry* 1993; 6: 489-493.
146. Huffman L, Connors J, Hedge G: VIP and its homologues increase vascular conductance in certain endocrine and exocrine glands. *American Journal of Physiology* 1988; 254(4Pt1): 435-442.
147. Hunt RD, Capper L, O'Connell P: Clonidine in child and adolescent psychiatry. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology* 1990; 1: 87-102.
148. Hunt RD, Hoehn R, Stephens KJ, Riley W, Osten C: Clinical patterns of ADHD: a treatment model based on brain functioning. *Compr. Therapy* 1994; 20(2): 106-112.
149. Hynd GW, Semrud-Clikeman M, Lorys AR, Novey ES, Eliopoulos D, Lyytinen H: Corpus callosum morphology in Attention Deficit-Hyperactivity Disorder: Morphometric analysis of MRI. *Journal of Learning Disabilities* 1991; 24: 141-146.

150. Hynd GW, Semrud-Clikeman M, Lorys AR, Novey ES, Eliopoulos D: Brain morphology in developmental dyslexia and attention deficit disorder/hyperactivity. *Archives of Neurology* 1990; 47: 919-926.
151. Ignarro LJ, Byrns R, Buga G, Woods K: Mechanisms of endothelium-dependent vascular smooth muscle relaxation elicited by bradykinin and VIP. *American Journal of Physiology* 1987; 253: 1074-1082.
152. Iikura M, Takaishi T, Hirai K, Yamada H, Iida M, Koshino T, Morita Y: Exogenous nitric oxide regulates the degranulation of human basophils and rat peritoneal mast cells. *International Archives of Allergy and Immunology* 1998; 115: 129-136.
153. Ito S, Kurokawa A, Ohga A, Ohta T, Sawabe K: Mechanical, electrical and cyclic nucleotide responses to peptide VIP and inhibitory nerve stimulation in rat stomach. *Journal of Physiology London* 1990; 430: 337-353.
154. Jeffrey A: Attention deficit disorder and the behavioral inhibition system: The relevance of the neuropsychological theory of attention deficit disorder: Criteria, cognition, intervention. Oxford, Pergamon Press 2000: 117-125.
155. Kaplan BJ, Mc Nicol J, Conte RA, Moghadam HK: Dietary replacement in preschool-aged hyperactive boys. *Pediatrics* 1989; 83(1): 7-17.
156. Katsushima S, Adachi H, Honda T, Sato S, Kusui T, Onishi S, Aoki E, Noguchi M, Konishi J: Cholecystokinin downregulates receptors for vasoactive intestinal peptide and secretin in rat pancreatic acini. *American Journal of Physiology* 1990; 258(3Pt1): 395-403.
157. Kelly P: A functional role for vasoactive intestinal polypeptide in anterior cingulate cortex.. *Nature* 1983; 304: 438-440.
158. Kiefer C: Das Schlafverhalten von Kindern mit nahrungsmittelinduziertem hyperkinetischen Syndrom. Diss., Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München 1997.
159. King SC, Slater P, Turnberg LA: Autoradiographic localization of binding sites for galanin and VIP in small intestine. *Peptides* 1989; 10(2): 313-317.
160. Kirschgessner A, Gerson M: Identification vagal efferent fibers and putative target neurons in the enteric nervous system of the rat. *Journal of Comparative Neurology* 1989; 285: 38-53.
161. Klein RG, Bessler AW: Stimulant side effects in children. In: Kane, JM, Lieberman JA (eds): *Adverse effects of psychotropic drugs*. New York: Guilford Press 1992: 470-496.
162. Klorman R: Cognitive event-related potentials in attention deficit hyperactivity disorder. *Journal of Learning Disabilities* 1991; 24: 130-140.
163. Korman LY, Sayadi H, Bass B, Moody TW, Harmon JW: Distribution of Vasoactive Intestinal Polypeptide and Substance P Receptors in Human Colon and Small Intestine. *Digestive Diseases and Sciences* 1989; 34(7): 1100-1108.

164. Krejs G, Fordtran J, Fahrenkrug J, Schaffalitzky-de-Muckadell O, Fischer J, Humphrey C, O'Dorisio T, Said S, Walsh J, Shulkes A: Effect of VIP infusion in water and ion transport in the human jejunum. *Gastroenterology* 1980; 78(4): 722-727.
165. Kristensen B, Georg B, Fahrenkrug J: Cholinergic regulation of VIP gene expression in human neuroblastoma cells. *Brain-Research* 1997; 775(1-2): 99-106.
166. Kuperman S, Johnson B., Arndt S, Lindgren S, Wolraich M: Quantitative EEG differences in a nonclinical sample of children with ADHD and undifferentiated ADD. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 1996; 35: 1009-1017.
167. LaHoste GJ, Swanson JM, Wigal SB, Glabe C, Wigal T, King N, Kennedy JL: Dopamine D4 receptor gene polymorphism is associated with attention deficit hyperactivity disorder. *Molecular Psychiatry* 1996; 1:128-131.
168. Landgren M, Kjellman B, Gillberg C: Attention deficit disorder with developmental coordination disorders. *Archives of Diseases in Childhood* 2000; 79(3): 207-212.
169. Larsson L, Edvinsson L, Fahrenkrug J, Hakanson R, Owman C, Schaffalitzky-de-Muckadell O, Sundler F: Immunohistochemical localization of a vasodilatory polypeptide (VIP) in cerebrovascular nerves. *Brain Research* 1976; 113: 400-404.
170. Larsson L, Fahrenkrug J, Hobst J, Schaffalitzky-de-Muckadell O: Innervation of the pancreas by vasoactive intestinal polypeptide (VIP) immunoreactive nerves. *Life Science* 1978; 22: 773-780.
171. Larsson L, Fahrenkrug J, Schaffalitzky-de-Muckadell O, Sundler F, Hakanson R, Rehfeld J: Localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) to central and peripheral neurons. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 1976; 73: 3197-3200.
172. Laufer MW, Denhoff E: Hyperkinetic behavior syndrome in children. *Journal of Pediatrics* 1957; 50: 463-474.
173. Leceta J, Martinez C, Delgado M, Garrido E, Gomariz R: Expression of vasoactive intestinal peptide in lymphocytes: a possible endogenous role in the regulation of the immune system. *Advances in Neuroimmunology* 1996; 6(1): 29-36.
174. Lehmacher W: Verlaufskurven und Crossover. *Medizinische Informatik und Statistik*, Springer Verlag Berlin Heidelberg 1987: 77-109.
175. Levy F, Hay DA, McStephen M, Wood C: Attention-deficit hyperactivity disorder: A category or a continuum? Genetic analysis of a large-scale twin study. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 1997; 36: 737-744.
176. Loeber R, Stouthamer-Loeber M, White HR: Developmental aspects of delinquency and internalizing problems and their association with persistent juvenile substance use between ages 7 and 18. *Journal of Clinical Child Psychology* 1999; 28(3): 322-332.

177. Lombroso PJ, Pauls DL, Leckman JF: Genetic mechanisms in childhood psychiatric disorders. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 1994; 33: 921-938.
178. Lopez RE: Hyperactivity in twins. *Canadian Psychiatric Association Journal* 1965; 10: 421-426.
179. Loren I, Emson P, Fahrenkrug J, Bjorklund A, Alumets J, Hakanson R, Sundler F: Distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the rat and mouse brain. *Neuroscience* 1979; 4(12): 1953-1976.
180. Lou HC, Henriksen L, Bruhn P, Borner H, Nielson J: Striatal dysfunction in attention deficit and hyperkinetic disorder. *Archives of Neurology* 1989; 46: 48-52.
181. Lou HC, Henriksen L, Bruhn P: Focal cerebral hypoperfusion in children with dysphasia and/or attention deficit disorder. *Archives of Neurology* 1984; 41: 825-829.
182. Lou HC: Methylphenidate reversible hypoperfusion of striatal regions in ADHD. in: Conners K, Kinsbourne M: *Attention Deficit Hyperactivity Disorder*. MMV Medizin Verlag, Munich 1990: 137-148.
183. Luis J, Muller JM, Abadie B, Martin JM, Marvaldi J, Pichon J: Cycle of the vasoactive intestinal peptide and its binding site in a human adenocarcinoma cell line (HT 29). *European Journal of Biochemistry* 1986; 156(3): 631-636.
184. Magistretti PJ, Morrison JH, Shoemaker WJ, Bloom FE: Morphological and functional correlates of VIP neurons in cerebral cortex. *Peptides* 1984; 5(2): 213-218.
185. Mann C, Lubar JF, Zimmerman AW, Miller CA, Muenchen RA: Quantitative analysis of EEG in boys with Attention-deficit-hyperactivity Disorder: Controlled study with clinical implications. *Pediatric Neurology* 1992; 8: 30-36.
186. Mannuzza S, Klein RG, Bessler A, Malloy P, Hynes ME: Educational and occupational outcome of hyperactive boys grown up. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 1997; 36(9): 1222-1227.
187. Mannuzza S, Klein RG, Bessler A, Malloy P, LaPadula M: Adult psychiatric status of hyperactive boys grown up. *American Journal of Psychiatry* 1998; 155(4): 493-498.
188. Mantyh P: Autoradiographic localization and characterization of receptor binding sites in the brain and peripheral tissues. In: *Receptor Localization: Ligand Autoradiography*. Alan R. Liss 1988: 9-36.
189. Marcotte AC, Thacher PV, Butters M, Bortz J, Acebo C, Carskadon MA: Parental report of sleep problems in children with attentional and learning disorders. *Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics* 1998; 19(3): 178-186.
190. Martin J, Dietl M, Hof P, Palacios J, Magistretti P: Autoradiographic mapping of (mono(125I)iodo-Tyr¹⁰, Met⁰¹⁷) vasoactive intestinal peptide binding sites in rat brain. *Neuroscience* 1987; 23: 539-565.

191. Matsuura M, Okubo Y, Toru M, Kojima T, He Y, Hou Y, Shen Y, Lee CK: A cross-national EEG study of children with emotional and behavioral problems: A WHO-collaborative study in the Western Pacific region. *Biological Psychiatry* 1993; 34: 59-65.
192. Mattes J, Gittelmann-Klein R: A cross-over study of artificial food colorings in a hyperkinetic child. *American Journal of Psychiatry* 1978; 135(8): 987-988.
193. Maurice DH, Haslam RJ: Nitroprusside enhances isoprenaline-induced increases in cAMP in rat aortic smooth muscle. *European Journal of Pharmacology* 1990; 191(3): 471-475.
194. Mc Culloch J, Kelly PA, Uddmann R, Edvinsson L: Functional role of vasoactive intestinal polypeptide in the caudate nucleus: a 2-deoxy [14C] glucose investigation. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 1983; 80(5):1472-1476.
195. McGee R, Stanton WR, Sears MR: Allergic disorders and attention deficit disorder in children. *Journal of Abnormal Child Psychology* 1993; 21: 79-88.
196. McKirdy H: Novel autonomic neurotransmitters and upper gastrointestinal function. *Pharmacology and Therapeutics* 1988; 38(3): 429-452.
197. Mendelson W, Johnson N, Stewart M: Hyperactive children as teenagers: a follow up study. *Journal of Nervous and Mental Disease* 1971; 153: 273-279.
198. Menkes MM, Rowe IS, Menkes IH: A 25 year follow-up study on the hyperkinetic child with minimal brain dysfunction. *Pediatrics* 1967; 39: 393-399.
199. Mertz H, Morgan V, Tanner G, Pickens D, Price R, Shyr Y, Kessler R: Regional cerebral activation in irritable bowel syndrome and control subjects with painful and nonpainful rectal distention. *Gastroenterology* 2000; 118(5): 972-974.
200. Misbin RI, Wolfe MM, Morris P, Buynitzky SJ, McGuigan JE: Uptake of vasoactive intestinal peptide by rat liver. *American Journal of Physiology* 1982; 243(2): 103-111.
201. Miyajima I, Dombrowicz D, Martin TR, Ravetch JV, Kinet JP, Galli SJ: Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG1 and FcγRIII. *Journal of Clinical Investigations* 1997; 99: 901-914.
202. Moneret Vautrin DA: Food Pseudo-Allergy. In: Pepys J, A.M. Edwards (eds): *The Mast Cell*. Pitman Medical 1979.
203. Morrison J, Shoemaker W, Bloom F: Morphological and functional correlates of VIP neurons in cerebral cortex. *Peptides* 1984; 5: 213-218.
204. Mutt V, Said, SI: Structure of the porcine vasoactive intestinal octacosapeptide. The amino acid sequence. Use of kallikrein in its determination. *European Journal of Biochemistry* 1974; 42: 581-589.
205. Nilsson S, Bill A: Vasoactive intestinal polypeptide (VIP): effects in the eye and on regional blood flows. *Acta Physiologica Scandinavica* 1984; 121(4): 385-392.

206. Nishizawa M, Hayakawa Y, Yanihara N, Okamoto H: Nucleotide sequence divergence and functional constraint in VIP precursor mRNA evolution between human and rat. *FEBS Letters* 1985; 183: 55-59.
207. Nomura T, Fukudo S, Matsuoka H, Hongo M: Abnormal electroencephalogram in irritable bowel syndrome. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1999; 34(5): 478-484.
208. Oades AD, Daniels R, Rascher W: Plasma neuropeptide-Y levels, monoamine metabolism, electrolyte excretion and drinking behavior in children with attention-deficit hyperactivity disorder. *Psychiatry Research* 1998; 80(2): 177-186.
209. Ottaway CA: In vitro alteration of receptor for vasoactive intestinal polypeptide changes the in vivo localization of mouse T-cells. *Journal of Experimental Medicine* 1984; 160: 1054-1069.
210. Pandol S, Dharmasathaphorn K, Schoeffield M, Vale W, Rivier J: Vasoactive intestinal peptide receptor antagonist (4Cl-DPhe⁶,Leu¹⁷)VIP. *American Journal of Physiology* 1986; 250: G553-557.
211. Park S, Ison T, Ercal N, Summers M, ODorisio M: Characterization of vasoactive intestinal peptide receptors on human megakaryocytes and platelets. *Blood* 1996; 87(11): 4629-4635.
212. Pauls DL: Genetic influences on child psychiatric conditions. In M. Lewis (Ed.), *Child and adolescent psychiatry: A comprehensive textbook*. Baltimore, MD: Williams and Wilkins, 1990: 351-363.
213. Pearse A: The gut as an endocrine organ. *British Journal of Hospital Medicine* 1974; 11: 697-707.
214. Pearson RK, Anderson B, Dixon JE: Molecular biology of the peptide hormone families. Division of Gastroenterology and Internal Medicine, Mayo Medical Center, Rochester, Minnesota. *Endocrinol-Metab-Clin-North-Am.* 1993; 22(4): 753-774.
215. Pedersen-Bjergaard U, Host U, Kelbaek H, Schifter S, Rehfeld JF, Faber J, Christensen NJ: Influence of meal composition on postprandial peripheral plasma concentrations of vasoactive peptides in man. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 1996; 56(6): 497-503.
216. Pelham WE, Wheeler T, Chronis A: Empirically supported psychosocial treatments for attention deficit hyperactivity disorder. *Journal of Clinical Child Psychology* 1998; 27: 190-205.
217. Perrin S, Last CG: Relationship between ADHD and anxiety in boys: Results from a family study. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 1996; 35: 988-996.
218. Piek J, Pitcher T, Hay D: Motor coordination and kinaesthesia in boys with attention deficit-hyperactivity disorder. *Developmental Medicine and Child Neurology* 1999; 41(3): 159-165.

219. Popma J, Smitherman TC, Bedotto JB, Eichhorn EJ, Said SI, Dehmer GJ: Direct coronary vasodilation induced by intracoronary vasoactive intestinal peptide. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 1990; 16(6): 1000-1006.
220. Pribram KH, McGuiness D: Arousal, activation, and effort in the control of activation. *Psychological Review* 1975; 2: 116-149.
221. Pruss R, Moskal J, Eiden L, Beinfield M: Specific regulation of vasoactive intestinal polypeptide biosynthesis by phorbol ester in bovine chromaffin cells. *Endocrinology* 1985; 117: 1020-1026.
222. Quay HC: Inhibition and attention deficit hyperactivity disorder. *Journal of Abnormal Child Psychology* 1997; 25(1): 7-13.
223. Quay HC: Theories of ADHD. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 1988; 27(2): 262-263.
224. Quilliam L, Dobson P, Brown B: Modulation of cyclic AMP accumulation of GH₃ cells by a phorbol ester and thyroliberin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1985; 129: 898-903.
225. Quinn PO, Rapaport JL: One -year follow-up of hyperactive boys treated with imipramine or methylphenidate. *American Journal of Psychiatry* 1975; 132: 241-245.
226. Randolph TG: Allergy as causative factor of fatigue irritability and behavior problems of children. *Journal of Pediatrics* 1947; 31: 560-572.
227. Rapp DJ: Does diet affect hyperactivity? *Journal of Learning Disorder* 1978; 11(6): 383-389.
228. Reubi JC, Waser B, Schmassmann A, Laissue J: Receptor autoradiographic evaluation of cholecystikinin, neurotensin, somatostatin and vasoactive intestinal peptide receptors in gastro-intestinal adenocarcinoma samples: where are they really located? *International Journal of Cancer* 1999; 81: 376-386.
229. Rosselin G, Anteunis A, Astesano A, Boissard C, Gali P, Hejblum G, Marie JC: Regulation of the Vasoactive Intestinal Peptide Receptor. *Annals of the New York Academy of Science* 1988; 27: 220-237.
230. Rosselin G, Laburthe M, Bataille D, Prieto J, Dupont C, Amiranoff B, Broyart J, Besson J: Receptors and effectors of vasoactive intestinal polypeptide in cell function and differentiation. In: Dumont & Nunez (eds.): *Hormones and Cell Regulation*, Elsevier Amsterdam 1980; 4: 311-330.
231. Roth N, Beyreiss J, Schlenzka K, Beyer H: Coincidence of attention deficit disorder and atopic disorders in children: empirical findings and hypothetical background. *Journal of Abnormal Child Psychology* 2000; 19(1): 1-13.
232. Rousset M, Laburthe M, Chevalier G, Boissard C, Rosselin G, Zwiebaum A: Vasoactive intestinal peptide (VIP) control glycogenolysis in human colon carcinoma cell line HT-29 in culture: *FEBS Letters* 1981; 126: 38-40.

233. Rowe AH: Food allergy; its manifestations, diagnosis and treatment. *Journal of the American Medical Association* 1928; 91(21): 1623-1631.
234. Rowe KF: Synthetic food colourings and hyperactivity: A double blind cross over study. *Australian Pediatric Journal* 1988; 24: 143-147.
235. Rubia K, Overmeyer S, Taylor E, Bullmore E, Brammer M, Williams S, Simmons A, Andrew C: Inhibitory control of hyperactive adolescents in fMRI. in: A.W. Toga, R.S.J. Frackowiak, J.C. Mazziotta: *Neuroimage. Third International Conference on Functional Mapping of the Human Brain*. New York, Academic Press, 1997.
236. Safer DJ, Allen R, Barr E: Growth rebound after termination of stimulant drugs. *Journal of Pediatrics* 1975; 86(1): 113-116.
237. Said SI, Mutt V: Potent peripheral and splanchnic vasodilator peptide from the normal gut. *Nature* 1970; 225: 863-864.
238. Said SI: *Vasoactive Intestinal Peptide*. New York, Raven Press 1982.
239. Salomon R, Couvineau A, Rouyer-Fessard C, Voisin T, Lavallee D, Blais A, Darmoul D, Laburthe M: Characterization of a common VIP-PACAP receptor in human small intestinal epithelium. *American Journal of Physiology* 1993; 264: 294-300.
240. Sanders AF: Towards a model of stress and performance. *Acta Psychologica* 1983; 53: 61-97.
241. Satterfield JH, Hoppe C, Shell A: A prospective study of delinquency in 110 adolescent boys with attention deficit disorder and 88 normal adolescent boys. *American Journal of Psychiatry* 1999; 139: 795-798.
242. Satterfield JH, Hoppe CM, Schell AM: A prospective study of delinquency in 110 adolescent boys with attention deficit disorder and 88 normal adolescent boys. *American Journal of Psychiatry* 1982; 139(6): 795-798.
243. Satterfield JH, Satterfield BT: Three-year multimodality treatment study of 100 hyperactive boys. *Journal of Pediatrics* 1981; 98(4): 650-655.
244. Schaffalitzky-de-Muckadell OB, Fahrenkrug J, Holst JJ, Lauritsen KB: Release of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) by intraduodenal stimuli. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1977; 12: 793-799.
245. Schmidt MH, Esser G, Moll GH: Der Verlauf hyperkinetischer Syndrome in klinischen und Feldstichproben. *Zeitschrift für Kinder- und Jugendpsychiatrie* 1991; 19: 240-247.
246. Schulte-Körne G, Deimel W, Gutenbrunner C, Hennighausen K, Blank R, Rieger C, Renschmidt H: Effect of an oligo-antigen diet on the behavior of hyperkinetic children. *Zeitschrift für Kinder-Jugendpsychiatrie und Psychotherapie* 1996; 176-183.
247. Semrud-Clikeman M, Filipek PA, Biederman J, Steingard RJ, Kennedy DN, Renshaw PF, Bekken K: Attention-Deficit Hyperactivity Disorder: Magnetic Resonance Imaging morphometric analysis of the corpus callosum. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 1994; 33: 875-881.

248. Sergeant JA: Hyperkinetic disorder revisited. European approaches to hyperkinetic disorder. In: Eunythydis, Amsterdam 1995; 7-17.
249. Sergeant JA: The cognitive-energetic model of ADHD. Paper presented at the annual meeting of the International Society for Research in Child and Adolescent Psychopathology, Los Angeles, CA 2000.
250. Shannon WR: Neuropathic manifestations in infants and children as a result of anaphylatic reactions to foods contained in their dietary. American Journal of Diseases in Childhood 1922; 24: 89-94.
251. Shekim WO, Dekirmenjian H, Chapel JL, Javaid J, Davis J M: Norepinephrine metabolism and clinical response to dextroamphetamine in hyperactive boys. Journal of Pediatrics 1979; 95(3): 389-394.
252. Sherman DK, Iacono WG, McGue MK: Attention-deficit hyperactivity disorder dimensions: A twin study of inattention and impulsivity-hyperactivity. Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry 1997; 36: 745-753.
253. Shimatsu A, Kato Y, Matsushita N, Katakami H, Ohta H, Yanaihara N, Imura H: Effect of prostaglandin E1 on vasoactive intestinal polypeptide release from the hypothalamus and on prolactin secretion from the pituitary in rats. Endocrinology 1983; 113: 2059-2064.
254. Shimatsu A, Kato Y, Matsushita N, Katakami H, Yanaihara N, Imura N: Stimulation by serotonin of vasoactive intestinal polypeptide release into rat hypophysial portal blood. Endocrinology 1982; 111: 338-340.
255. Sieg KG, Gaffney GR, Preston DF, Helligs JA: SPECT brain imaging anomalies in attention deficit hyperactivity disorder. Clinical Nuclear Medicine 1995; 20: 55-60.
256. Silberg J, Rutter M, Meyer J, Maes H, Hewett J, Simonoff E, Pickles A, Loeber R, Eaves L: Genetic and environmental influences on the covariation between hyperactivity and conduct disturbance in juvenile twins. Journal of Child Psychology and Psychiatry 1996; 37: 803-816.
257. Singer HS, Reiss AL, Brown JE, Aylward EH, Shih B, Chee E, Harris EL, Reader MJ, Chase GA, Bryan RN, Denckla MB: Volumetric MRI changes in basal ganglia of children with Tourette's syndrome. Neurology 1993; 43: 950-956.
258. Smitherman TC, Popma JJ, Said SI, Krejs GJ, Dehmer GJ: Coronary hemodynamic effects of intravenous vasoactive intestinal peptide in humans. American Journal of Physiology 1989; 257(4): 1254-1262.
259. Snyder SH: How amphetamine acts in minimal brain dysfunction. Academic Science Annals, New York 1973, 205-310.
260. Sobotta J: Atlas der Anatomie des Menschen. Urban und Schwarzenberg, Hrsg. Staubesand, J, München, 1988; 181 u. 194.

261. Spencer T, Biederman J, Wilens T, Guite J, Harding M: ADHD and thyroid abnormalities: a research note. *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 1995; 36(5): 879-885.
262. Spencer T, Biederman J, Wilens T, Harding M, O'Donnell D, Griffin S: Pharmacotherapy of attention-deficit hyperactivity disorders across the life cycle. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 1996; 35: 409-432.
263. Spivak B, Vered Y, Yoran-Hegesh R, Averbuch E, Mester R, Graf E, Weizman A: Circulatory levels of catecholamines, serotonin and lipids in attention deficit hyperactivity disorder. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 1999; 99(4): 300-304.
264. Sreedharam SP, Huang J, Cheung M, Goetzl EJ: Structure , expression and chromosomal localization of the type I human vasoactive intestinal peptide receptor gene. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 1994; 92: 2939-2943.
265. Sreedharam SP, Robichon A, Peterson KE, Goetzl EJ: Cloning and expression of the human vasoactive intestinal peptide receptor. *Biochemical and Biophysiological Research Communication* 1993; 193: 546-553.
266. Steinhausen HC, Romahn G, Göbel D: Computer analyzed EEG in methylphenidate-responsive hyperactive children. *Neuropediatrics* 1984; 15(1): 28-32.
267. Stevenson J: Evidence for genetic aetiology in hyperactivity in children. *Behavior Genetics* 1992; 22: 337-344.
268. Stewart M, Mendelson W, Johnson N: Hyperactive children as adolescents: how they describe themselves. *Child Psychiatry and Human Development* 1973; 4: 3-11.
269. Stine JJ: Symptom alleviation on the hyperactive child by dietary modification: a report of 2 cases. *American Journal of Orthopsychiatry* 1976; 46(4): 637-645.
270. Strauss AA, Lethinen L: *Psychopathology and education of the brain injured child*. Grune and Stratton, New York, 1947.
271. Stumpf WE, Roth LJ: High resolution autoradiography with dry mounted, freeze-dried frozen sections: comparative study of six methods using two diffusible compounds [³H] estradiol and [³H] mesobilirubinogen. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1966; 14: 274-287.
272. Sunohara G, Barr C, Jain U, Schachar R, Roberts W, Tannock R, Malone M, Kennedy JL: Association of the D4 receptor gene in individuals with ADHD: 1, a family-based control study of children with ADHD; 2) a case-control of adults with ADHD. *American Journal of Human Genetics* 1997; 61: A 296.
273. Swanson JM, Kinsbourne M: Food dyes impair performance of hyperactive children on a laboratory learning test. *Science* 1980; 207: 1485-1486.
274. Swanson JM, Mc Burnett K, Wigal T: Effect of stimulant medication on children with attention deficit disorder: a review of reviews. *Except Child* 1993; 60: 154-162. 1993.

275. Swanson JM, Sunohara GA, Kennedy JL, Regino R, Fineberg E, Wigal T, Lerner M, Williams L, LaHoste GJ, Wigal S: Association of the dopamine receptor D4 (DRD4) gene with a refined phenotype of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): a family-based approach. *Molecular Psychiatry* 1998; 3(1): 38-41.
276. Synnerstad I, Ekblad E, Sundler F, Holm L: Gastric mucosal smooth muscles may explain oscillations in glandular pressure: Role of vasoactive intestinal peptide. *Gastroenterology* 1998; 114 (2): 284-294.
277. Szatmari P: The epidemiology of attention-deficit hyperactivity disorders. in G. Weiss (Ed), *Child and adolescent psychiatric clinics of North America: Attention-Deficit Hyperactivity disorder*. Philadelphia, PA: Saunders 1992; 361-372.
278. Szewczak SM, Behar J, Billett G, Hillemeier C, Rhim BY, Biancani P: VIP-induced alterations in cAMP and inositol phosphates in the lower esophageal sphincter. *American Journal of Physiology* 1990; 259(2 Pt 1): 239-244.
279. Tannock R: Attention Deficit Hyperactivity Disorder: Advances in Cognitive, Neurobiological, and Genetic Research. *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 1998; 39: 65-99.
280. Teicher M, Ito Y, Glod C, Barber N: Objective measurement of hyperactivity and attentional problems in ADHD. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 1996; (35): 334-342.
281. Thapar A, McGuffin P: Are anxiety symptoms in childhood heritable? *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 1995; 36: 439-447.
282. Thorley G: Pilot study to assess behavioral and cognitive effects of artificial food colours in a group of retarded children. *Developmental Medicine and Child Neurology* 1984; 26: 56-61.
283. Thulin L, Nyberg B, Tyden G, Sonnenfeld T: Circulatory effects of VIP in anesthetized man. *Peptides* 1984; 5(2): 319-323.
284. Tirosh E, Cohen A: Language deficit with attention-deficit disorder: a prevalent comorbidity. *Journal of Child Neurology* 1998; 13(10): 493-497.
285. Tirosh E, Cohen A: Language deficit with attention-deficit disorder: a prevalent comorbidity. *Journal of Child Neurology* 1999; 13(10): 493-497.
286. Toccafondi RS, Brandi ML, Melander A: Vasoactive intestinal peptide stimulation of human thyroid cell function. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1984; 58(1): 157-160.
287. Toren P, Karasik A, Eldar S, Wolmer L, Shimon I, Weitz R, Inbar D, Koren S, Pariente C, Reiss A, Weizman R, Laor N: Thyroid function in attention deficit and hyperactivity disorder. *Journal of Psychiatric Research* 1997; 31(3): 359-363.
288. Tryphonas H, Trites R: Food allergy in children with hyperactivity, learning disabilities and/or minimal brain dysfunction. *Annals of Allergy* 1979; 42(1): 22-27.

289. Tuncel N, Erkasap N, Sahinturk V, Ak D, Tuncel M: The protective effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on stress-induced gastric ulceration in rats. *Annals of The New York Academy of Science* 1998; 865: 309-322.
290. Tuncel N, Tore F, Sahinturk V, Ak D, Tuncel M: Vasoactive intestinal peptide inhibits degranulation and changes granular content of mast cells: a potential therapeutic strategy in controlling septic shock. *Peptides* 2000; 21(1): 81-89.
291. Turner J, Jones S, Bylund D: A fragment of vasoactive intestinal peptide, VIP (10-28), is an antagonist of VIP in the colon carcinoma cell line HT29. *Peptides* 1986; 7: 849-854.
292. Uhlig T, Merckenschlager A, Brandmeier R, Förster C, Egger J: Topographische Beschreibung quantitativer EEG-Parameter bei Kindern mit nahrungsmittelinduziertem hyperkinetischen Syndrom. *Aktuelle Neuropädiatrie* 1992.
293. Unwin RJ, Reed T, Thom S, Peart WS, Calam J: Effects of indomethacin and (+/-)-propranolol on the cardiovascular and renin responses to vasoactive intestinal polypeptide (VIP) infusion in man. *British Journal of Clinical Pharmacology* 1987; 23(5): 523-8.
294. Valentine J, Rossi E, O'Leary P, Parry TS, Kurinczuk JJ, Sly P: Thyroid function in a population of children with attention deficit hyperactivity disorder. *Journal of Paediatric Child-Health* 1997; 33(2): 117-120.
295. Van der Meere JJ: The role of attention. *Monographs in child and adolescent psychiatry. Hyperactivity disorders of childhood*, Cambridge University Press, Cambridge 1996; 109-146.
296. Varley CK, McClellan J: Case study: two additional sudden deaths with tricyclic antidepressants. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 1997; 36: 390-394.
297. Wagner K: Persönliche Mitteilung, Dr. v. Haunersches Kinderspital, München 1998.
298. Waldman ID, Rowe DC, Abramowitz A, Kozel ST, Mohr JH, Sherman SL, Cleveland HH., Sanders ML, Gard JM, Stever C: Association and linkage of the dopamine transporter gene and attention-deficit hyperactivity disorder in children: heterogeneity owing to diagnostic subtype and severity. *American Journal of Human Genetics* 1998; 63(6): 1767-1776.
299. Walther B: Nahrungsphosphat und Verhaltensstörung im Kindesalter. Ergebnisse einer kontrollierten Diätstudie: Steinhausen HC (ed): *Das konzentrationsgestörte und hyperaktive Kind*. Kohlhammer Verlag Stuttgart, Berlin, Köln, Mainz, 1984.
300. Wang YC, Chong MY, Chou WJ, Yang JL: Prevalence of attention deficit hyperactivity disorder in primary school children in Taiwan. *Journal of the Formosan Medical Association* 1993; 92(2): 133-138.
301. Wattchow D, Furness J, Costa M: Distribution and coexistence of peptides in nerve fibers of the external muscle of the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 1988; 84: 32-41.

302. Weinberg W, Brumback R: Primary disorder of vigilance: a novel explanation of inattentiveness, daydreaming, boredom, restlessness, and sleepiness. *Journal of Pediatrics* 1990; 116(3): 720-725.
303. Weiss G, Hechtman L, Perlman T, Hopkins J, Werner A: Hyperactives as young adults; A controlled prospective ten-year follow-up of 75 children. *Archives of General Psychiatry* 1979; 36: 675-681.
304. Weiss G, Kruger E, Danielson U, Elman M: Effect of long-term treatment of hyperactive children with methylphenidate. *Canadian Medical Association Journal* 1975; 112(2): 159-165.
305. Weiss G, Minde K, Werry J: Studies on the hyperactive child. VIII 5 year follow up. *Archives of General Psychiatry* 1999; 24: 409-414.
306. Weiss G, Minde K, Werry JS, Douglas V, Nemeth E: Studies on the hyperactive child. 8. Five-year follow-up. *Archives of General Psychiatry* 1971; 24(5): 409-14.
307. Weiss G, Williams JH, Margen SH, Abrams B, Caan B: Behavior responses to artificial food colours. *Science* 1980; 207:1487-1488.
308. Weiss RE, Stein MA, Refetoff S: Behavioral effects of liothyronine (L-T3) in children with attention deficit hyperactivity disorder in the presence and absence of resistance to thyroid hormone. *Thyroid* 1997; 7(3): 389-393.
309. Weiss RE, Stein MA, Trommer B, Refetoff S: Attention-deficit hyperactivity disorder and thyroid function. *The Journal of Pediatrics* 1993; 123(4): 539-545.
310. Wender EH: The food additive-free diet in the treatment of behavior disorders: a review. *Journal of Development and Behavior in Pediatrics* 1986; 7(1): 35-42.
311. Whalen CK, Henker BP: Psychostimulants and children: a review and analysis. *Psychological Bulletin* 1976; 83: 1113-1130.
312. Wiik P: Glucocorticoids upregulate the high affinity receptors for vasoactive intestinal peptide (VIP) on human mononuclear leucocytes in vitro. *Regulation of Peptides* 1991; 35(1): 19-30.
313. Willerman L: Activity level and hyperactivity in twins. *Child Development* 1973; 44: 288-293.
314. Williams JI, Cram DM, Tausig FT, Webster E: Relative effects of drugs and diet on hyperactive behaviors: An experimental study . *Pediatrics* 1978; 61: 811-817.
315. Willis E, Ottesen B, Wagner G, Sundler F, Fahrenkrug J: Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) as a possible neurotransmitter involved in penile erection. *Acta Physiologica Scandinavica* 1981; 113(4): 545-547.
316. Winding B, Wiltink A, Foged N: Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptides and vasoactive intestinal peptide inhibit bone resorption by isolated rabbit osteoclasts. *Experimenta Physiology* 1997; 82(5): 871-886.

317. Wolosin J, Thomas F, Hogan D, Koss M, O'Dorisio T, Isenberg J: The effect of vasoactive intestinal peptide, secretin, and glucagon on human duodenal bicarbonate secretion. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1989; 24(2): 151-157.
318. Wood JD, Alpers DH, Andrews PL: Fundamentals of neurogastroenterology. *Gut* 1999; 45(Suppl. 2): II-III16.
319. World Health Organisation. The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders: clinical descriptions and diagnostic guidelines. World Health Organisation, Geneva 1992.
320. Ye VZ, Duggan KA: The effect of dietary sodium on the concentrations of vasoactive intestinal peptide in plasma and lung. *Chest* 1995; 108(2): 535-538.
321. Young W, Kuhar S: A new method for receptor autoradiography: [3H] opioid receptors in rat brain. *Brain Research* 1979; 179: 255-270.
322. Young W, Kuhar S: A new method for receptor autoradiography: (3H) opioid receptors in rat brain. *Brain Research* 1979; 179: 255-270.
323. Zametkin AJ, Liebenauer LL, Fitzgerald GA, King AC, Minkunas DV, Herscovitch P, Yamada EM, Cohen RM: Brain metabolism in teenagers with attention-deficit hyperactivity disorder. *Archives of General Psychiatry* 1993; 50: 333-340.
324. Zametkin AJ, Nordahl TE, Gross J, King C, Semple WE, Rumsey J, Hamberger MA, Cohen RM: Cerebral glucose metabolism in adults with hyperactivity of childhood onset. *New England Journal of Medicine* 1990; 323: 1361-1366.
325. Zeiner P, Bryhn G, Bjercke C, Truyen K, Strand G: Response to methylphenidate in boys with attention-deficit hyperactivity disorder. *Acta Paediatrica* 1999; 88(3): 298-303.
326. Zimmerman RP, Gates TS, Mantyh CR, Vigna SR, Welton ML, Passaro EP, Mantyh PW: Vasoactive Intestinal Polypeptide Receptor Binding Sites In The Human Gastrointestinal Tract: Localization By Autoradiography. *Neuroscience* 1989; 31(3): 771-783.
327. Zyss T, Hassler F: Quantitative evaluation of motor activity of children with hyperkinetic syndrome. *Psychiatry-Pol.* 1992; 26(1-2): 44-50.

Lebenslauf

Stephan Hiedl

geboren am 29. Juni 1967
in München, verheiratet

Schulbildung:

1974-1978	Grundschule München/Harlaching
1978-1987	Domgymnasium Freising (humanistisch-altsprachlicher Zweig)
26.06.1987	Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst:

1987-1989	Kreiskrankenhaus Freising
-----------	---------------------------

Studium:

Nov. 1989	Beginn des Medizinstudiums an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Aug. 1991	Medizinische Vorprüfung (Physikum)
Aug. 1992	Erstes Staatsexamen
Aug. 1995	Zweites Staatsexamen
Nov. 1996	Drittes Staatsexamen

Ärztliche Tätigkeit:

01.03.1997 – 30.08.1998	Arzt im Praktikum im Dr. von Haunerschem Kinderspital der Ludwig-Maximilians-Universität München
seit 01.09.1998	Assistenzarzt im Dr. von Haunerschem Kinderspital der Ludwig-Maximilians-Universität München
Klinische Schwerpunkte:	Hepatologie, angeborene Stoffwechselerkrankungen, pädiatrische Intensivmedizin

Lehrtätigkeit:

Tutor der München-Harvard Alliance

Vorträge und Publikationen:

Vorträge:	5. Tagung mitteleuropäischer Länder „Pädiatrische Forschung“, Wien, Jun. 1996: Duodenal VIP-Receptors in food induced attention deficit hyperkinetic syndrome.
	92. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, Lübeck, Sept. 1996: Duodenale VIP-Rezeptoren beim nahrungsmittelinduzierten hyperkinetischen Syndrom. Monatsschrift Kinderheilkunde: 1996, Suppl. 1, Band 144, Heft 8.

Informationsveranstaltung für Ärzte: Leben mit Phenylketonurie,
München, Nov. 2001:
Was hat sich beim Neugeborenencreening verändert.

Workshop für pädiatrische Diätetik, Fulda, Juni 2002: Erste Erfahrungen
mit dem Medium-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase-Mangel (MCAD-
Mangel) durch das erweiterte Neugeborenencreening.

Sitzung der Kinderärztlichen Gesellschaft Münchens, München,
Nov. 2002: Multifokale Pneumonie und Sepsis - Folgen einer Pharyngitis

Poster:

47. Jahrestagung der Süddeutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde und
Jugendmedizin, Freiburg, Mai 1998: Parvovirus B 19 induzierte
Myalgien bei einem 5-jährigen Jungen.

XXIXth Congress International Society of PsychoNeuroEndocrinology,
Trier, Aug. 1998: Duodenal VIP-Receptors in food induced attention
deficit hyperkinetic syndrome.

49th Annual Meeting of the AASLD (American Association for the Study
of Liver Diseases), Chicago, Nov. 1998: Infection with HCV during the
first year of life coincides with a high spontaneous clearance rate of the
virus and a benign clinical course.

95. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde und
Jugendmedizin, München, Sept. 1999: Viszerale Leishmaniose nach
Mittelmeerurlaub. Monatsschrift Kinderheilkunde: Suppl. 2, Band 147,
Heft 8.

Coautor:

Tacrolimus - Eine neue Standardtherapie in der Lebertransplantation,
Pabst Science Publishers, D-Lengerich, 1998: Basisimmunsuppression mit
Prograf[®] bei Kindern nach Lebertransplantation: Erfahrungen an 12
Patienten.

Diagnosestellung einer Glutarazidurie Typ I bei der Mutter im Rahmen
des erweiterten Neugeborenen-Screenings ihres Kindes.
Monatsschrift Kinderheilkunde: 2002, Band 150, Heft 1.

Tetrahydrobiopterin-Sensitivität: Ein charakteristisches Merkmal bei
mildem Phänotyp des Phenylalaninhydroxylasemangels.
Monatsschrift Kinderheilkunde: 2002, Band 150, Heft 7.

München, den 15. Mai 2003

Stephan Hiedl

Danksagung

Besonderen Dank möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. J. Egger aussprechen, der mich während der Durchführung dieser Arbeit hervorragend und stets motivierend betreute. Für das Erlernen der autoradiographischen Methode danke ich Herrn PD Dr. P. Heinz-Erian. Großer Dank gebührt auch Herrn Dr. J. Gais, der mir im Institut des Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit, GSF, die computerunterstützte Auswertung der Patientenbiopsate ermöglichte. Schließlich darf ich allen, die mich auf dem Entstehungsweg dieser Arbeit begleitet haben, großen Dank aussprechen.